

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Clairance d'iohexol mesurée par LC-MS chez des sujets recevant une combinaison  
de substance de contraste iohexol-iodixanol

par

Marie-Claude Denis

Département des sciences de la santé communautaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé

en vue de l'obtention du grade de

maître ès sciences (M.Sc.) en sciences cliniques

Septembre 2007

© Marie-Claude Denis, 2007

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Faculté de médecine et des sciences de la santé

Clairance d'iohexol mesurée par LC-MS chez des sujets recevant une combinaison  
de substance de contraste iohexol-iodixanol

par

Marie-Claude Denis

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Maryse Guay\_\_\_\_\_

Directrice de recherche

Jean Cusson\_\_\_\_\_

Codirecteur de recherche

Jacques Lemaire\_\_\_\_\_

Membre interne du jury

Pierre Thibault\_\_\_\_\_

Membre externe du jury

Mémoire accepté le \_\_\_\_\_

## TABLE DES MATIÈRES

<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>VII</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>VIII</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS ET DES SIGLES.....</b>	<b>XI</b>
<b>RÉSUMÉ .....</b>	<b>XIV</b>
 PREMIER CHAPITRE – INTRODUCTION.....	 1
 <b>DEUXIÈME CHAPITRE – RECENSION DES ÉCRITS .....</b>	 <b>5</b>
1. MISE EN CONTEXTE : IMAGERIE MÉDICALE .....	5
2. NÉPHROPATHIE LIÉE À L’EXPOSITION AUX SUBSTANCES DE CONTRASTE.....	8
2.1 Pathophysiologie de la néphropathie liée à l’exposition aux substances de contraste.....	8
2.2 Molécules de substances de contraste .....	12
2.3 Stratégies de prévention de la néphropathie liée à l’exposition aux substances de contraste .....	16
2.3.1 Hydratation saline .....	16
2.3.2 N-acétylcystéine.....	18
2.3.3 Prévention de la néphropathie liée à l’exposition aux substances de contraste dans le contexte des soins ambulatoires .....	20
3. MARQUEURS DE FILTRATION GLOMÉRULAIRE .....	21
3.1 Taux de créatinine sérique et sa clairance.....	21
3.2 Clairance de l’inuline .....	23
3.3 Clairance du <sup>99</sup> Tc <sup>m</sup> -DTPA.....	24

3.4	Clairance de la cystatine C .....	25
3.5	Clairance de l'iohexol .....	27
3.6	Clairance de l'iodixanol .....	28
4.	UTILISATION DE L'IOHEXOL ET DE L'IODIXANOL EN IMAGERIE : CONSIDÉRATIONS IMPORTANTES POUR L'APPLICATION CLINIQUE D'UNE ÉVENTUELLE MESURE DE LEUR CLAIRANCE.....	28
5.	MÉTHODOLOGIES ANALYTIQUES PERTINENTES .....	29
5.1	Mesure de la créatinine et de la cystatine C .....	30
5.2	Mesure de l'iohexol et de l'iodixanol .....	30
5.2.1	Électrophorèse capillaire .....	31
5.2.2	HPLC-MSD Tof.....	35
6.	PHARMACOCINÉTIQUE DE L'IOHEXOL ET DE L'IODIXANOL.....	41
6.1	Définition .....	41
6.2	Ordres de transfert et modèles compartimentaux.....	43
6.3	Paramètres de mesure.....	48
6.3.1	Volume de distribution apparent.....	48
6.3.2	Constantes de vitesse.....	49
6.3.3	Temps de demi-vie.....	50
6.3.4	Clairance plasmatique et clairance rénale .....	51
<b>TROISIÈME CHAPITRE : MÉTHODOLOGIE.....</b>		<b>52</b>
1.	MISE AU POINT DE LA MÉTHODE ANALYTIQUE POUR MESURER L'IOHEXOL ET L'IODIXANOL .....	52
1.1	Mesure de l'iohexol et de l'iodixanol .....	52



1.1.1	Electrophorèse capillaire .....	53
1.1.2	HPLC-MSD Tof.....	58
2.	ÉTUDE CLINIQUE : IOHEXOL ET IODIXANOL COMMME MARQUEURS DE FILTRATION GLOMÉRULAIRE CHEZ DES SUJETS EXPOSÉS SIMULTANÉMENT AUX DEUX SUBSTANCES DE CONTRASTE.....	58
2.1	Dispositif de l'étude .....	59
2.2	Population à l'étude.....	59
2.3	Échantillon .....	60
2.4	Recrutement des sujets.....	61
2.5	Variables à l'étude.....	62
2.6	Sources des données.....	62
2.7	Déroulement de l'étude .....	63
2.8	Analyse des données .....	66
2.8.1	Analyse descriptive .....	66
2.8.2	Analyse de comparaison .....	67
2.9	Considérations éthiques .....	68
<b>QUATRIÈME CHAPITRE : RÉSULTATS .....</b>		<b>71</b>
1.	VALIDATION DE LA MÉTHODE DE MESURE IOHEXOL-IODIXANOL.....	71
1.1	Électrophorèse capillaire .....	72
2.	RÉSULTATS OBTENUS AUPRÈS DES SUJETS CLINIQUES .....	78
2.1	Caractéristiques des sujets participants.....	78
2.2	Créatinine .....	81
2.3	Cystatine C .....	83

2.4	Cinétique de l'iohexol et de l'iodixanol.....	85
2.4.1	Article : « Development and evaluation of an LC-MS assay and its application for assessment of renal function », soumis à la revue <i>Journal of Chromatography A</i> .....	85
2.4.2	Calculs des clairances.....	109
2.5	Performance des marqueurs de filtration glomérulaire.....	111
3.	APPLICATIONS CLINIQUES .....	112
3.1	Pharmacocinétique .....	112
3.2	Marqueurs de filtration glomérulaire .....	114
<b>CINQUIÈME CHAPITRE : DISCUSSION.....</b>		<b>117</b>
1.	MÉTHODES DE SÉPARATION ANALYTIQUE.....	117
2.	QUANTIFICATION DE L'IOHEXOL ET DE L'IODIXANOL DANS LE PLASMA.....	118
3.	CORRÉLATIONS ENTRE LES DIFFÉRENTS MARQUEURS DE FILTRATION GLOMÉRULAIRE.....	121
4.	FORCES, LIMITES ET BIAIS .....	122
5.	PERSPECTIVES CLINIQUES .....	124
<b>SIXIÈME CHAPITRE : CONCLUSION.....</b>		<b>126</b>
<b>REMERCIEMENTS .....</b>		<b>128</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>		<b>131</b>

## LISTE DES ANNEXES

ANNEXE A –	VALIDATION CLINIQUE DE LA DÉTERMINATION DE LA CYSTATINE C PLASMATIQUE COMME MARQUEUR FIABLE DE LA FONCTION RÉNALE .....	145
ANNEXE B –	PROTOCOLE DES SOLUTIONS TAMPON POUR L'ÉLECTROPHORÈSE CAPILLAIRE .....	172
ANNEXE C –	PROTOCOLE DE LA SOLUTION MÈRE D'IOHEXOL ET DE LA COURBE STANDARD IOHEXOL .....	174
ANNEXE D –	PROTOCOLE DE LA SOLUTION MÈRE IODIXANOL ET DE LA COURBE STANDARD IODIXANOL .....	176
ANNEXE E –	PROTOCOLE DE LA SOLUTION MÈRE IOHEXOL-IODIXANOL ET DE LA COURBE STANDARD IOHEXOL-IODIXANOL .....	178
ANNEXE F –	PROTOCOLE DES ÉCHANTILLONS DE CONTRÔLE IOHEXOL .....	181
ANNEXE G –	PROTOCOLE DES ÉCHANTILLONS DE CONTRÔLE IODIXANOL .....	183
ANNEXE H –	PROTOCOLE DES ÉCHANTILLONS DE CONTRÔLE IOHEXOL-IODIXANOL .....	185
ANNEXE I –	FORMULAIRE DE CONSENTEMENT-VERSION FRANÇAISE ET ANGLAISE .....	187
ANNEXE J –	GRAPHIQUES DES CORRÉLATIONS ENTRE LA CLAIRANCE DE L'IOHEXOL ET LES MARQUEURS DE FILTRATION GLOMÉRULAIRE CONVENTIONNELS .....	198
ANNEXE K –	ANALYSES NON-PARAMÉTRIQUES- TEST MANN WHITNEY-WILCOXON POUR CHACUN DES GROUPES DE SUJETS .....	211
ANNEXE M –	EXEMPLES DE CALCULS PHARMACOCINÉTIQUES .....	213

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau I :	Données anthropométriques et facteurs de co-morbidités des sujets .	79
Tableau II :	Résultats des comparaisons non-paramétrique des variables anthropométriques des deux groupes de sujets.....	81
Tableau III :	Caractéristiques des 17 sujets et évaluation pré et 4 heures post-angiographie des concentrations de pCys C et pCr .....	82
Tableau IV:	Paramètres pharmacocinétiques et calculs de la clairance de l'iohexol et de l'iodixanol chez les 17 sujets .....	110
Tableau V :	Corrélations entre les différents marqueurs de filtration glomérulaire chez les 17 sujets .....	112
Tableau VI :	Comparaison des valeurs de clairance de créatinine, de cystatine C, d'iohexol et d'iodixanol à différents temps chez 17 sujets .....	116
Tableau VII :	Corrélations entre les différents marqueurs de filtration glomérulaire chez les 10 sujets ayant une fonction rénale normale .....	212
Tableau VIII :	Corrélations entre les différents marqueurs de filtration glomérulaire chez les 7 sujets ayant une fonction rénale réduite.....	212

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 :	Radiographies du bassin d'un sujet A) sans substance de contraste et B) avec injection de substance de contraste.....	6
Figure 2 :	Coupe frontale du rein droit illustrant l'anatomie interne de ce dernier ..	7
Figure 3 :	Représentation schématique des fonctions du néphron .....	8
Figure 4 :	Structures chimiques des molécules iohexol et iodixanol.....	12
Figure 5 :	Séquence d'acides aminés de la protéine Cystatine C .....	25
Figure 6 :	Schéma représentant un système d'électrophorèse capillaire .....	31
Figure 7:	Schéma représentant le principe de la chromatographie liquide à haute performance.....	37
Figure 8 :	Schéma d'une source à nébulisation électrostatique.....	38
Figure 9:	Schéma représentant le processus électrochimique de la formation des ions positifs par nébulisation électrostatique .....	39
Figure 10 :	Représentation d'un spectromètre de masse à temps de vol à réflectron .....	39
Figure 11 :	HPLC-MSD Tof de Agilent Technologies .....	41
Figure 12 :	Représentation graphique de la réaction d'ordre 0 .....	44
Figure 13 :	Représentation graphique de la réaction d'ordre un A) et de sa transformation logarithmique B).....	45
Figure 14 :	Représentation schématique du modèle à 1 compartiment.....	47
Figure 15 :	Représentation schématique du modèle à 2 compartiments .....	47
Figure 16 :	Représentation graphique des phases de distribution et d'élimination pour un modèle pharmacocinétique à deux compartiments.....	50
Figure 17 :	Schéma représentant le dispositif de recherche quasi-expérimental à séries temporelles post-intervention pour deux groupes de sujets .....	59

Figure 18:	Électrophérogramme d'un échantillon standard de 160 mg/L iohexol sans plasma .....	73
Figure 19:	Électrophérogramme d'un échantillon standard de 160 mg/L iodixanol sans plasma .....	74
Figure 20:	Électrophérogramme d'un échantillon standard de 160 mg/L iohexol avec plasma .....	75
Figure 21:	Électrophérogramme d'un échantillon standard de 160 mg/L iodixanol avec plasma .....	76
Figure 22:	Électrophérogramme d'un échantillon standard de 160 mg/L iohexol-iodixanol avec plasma.....	77
Figure 23 :	Détermination de la corrélation entre les concentrations de protéines cystatine C et de la créatinine pour la mesure 4 heures post- intervention chez 17 sujets .....	84
Figure 24 :	Détermination de la corrélation entre la clairance de l'iohexol et la clairance de la créatinine calculée (ClCrC) pour la mesure 4 heures post-intervention chez 17 sujets.....	199
Figure 25:	Détermination de la corrélation entre la clairance de l'iohexol et la clairance de la créatinine calculée (ClCrC) pour la mesure 4 heures post-intervention chez 10 sujets ayant une fonction rénale normale .....	200
Figure 26 :	Détermination de la corrélation entre la clairance de l'iohexol et la clairance de la créatinine calculée (ClCrC) pour la mesure 4 heures post-intervention chez 7 sujets dont la fonction rénale est diminuée.....	201
Figure 27 :	Détermination de la corrélation entre la clairance de l'iohexol et la clairance de la créatinine selon le MDRD (ClCr MDRD) pour la mesure 4 heures post-intervention chez 17 sujets.....	202
Figure 28:	Détermination de la corrélation entre la clairance de l'iohexol et la clairance de la créatinine selon le MDRD (ClCr MDRD) pour la mesure 4 heures post-intervention chez 10 sujets ayant une fonction rénale normale.....	203
Figure 29:	Détermination de la corrélation entre la clairance de l'iohexol et la clairance de la créatinine selon le MDRD (ClCr MDRD) pour la mesure 4 heures post-intervention chez 7 sujets ayant une fonction rénale réduite .....	204

Figure 30 : Détermination de la corrélation entre la clairance de l'iohexol et la clairance de la cystatine C pour la mesure 4 heures post-intervention chez 17 sujets .....	205
Figure 31 : Détermination de la corrélation entre la clairance de l'iohexol et la clairance de la cystatine C pour la mesure 4 heures post-intervention chez 10 sujets ayant une fonction rénale normale.....	206
Figure 32 : Détermination de la corrélation entre la clairance de l'iohexol et la clairance de la cystatine C pour la mesure 4 heures post-intervention chez 7 sujets ayant une fonction rénale réduite.....	207
Figure 33 : Détermination de la corrélation entre la clairance de l'iohexol et la clairance de l'iodixanol pour la mesure 4 heures post-intervention chez 17 sujets.....	208
Figure 34 : Détermination de la corrélation entre la clairance de l'iohexol et la clairance de l'iodixanol pour la mesure 4 heures post-intervention chez 10 sujets ayant une fonction rénale normale .....	209
Figure 35 : Détermination de la corrélation entre la clairance de l'iohexol et la clairance de l'iodixanol pour la mesure 4 heures post-intervention chez 7 sujets ayant une fonction rénale réduite .....	210

## LISTE DES ABRÉVIATIONS ET DES SIGLES

CE	Électrophorèse capillaire (capillary electrophoresis)
CIN	Contrast-induced nephropathy
Cl	Clairance
ClCr	Clairance de créatinine
ClCrC	Clairance de créatinine calculée
ClCrM	Clairance de créatinine mesurée
Co	Concentration initiale
COO	Groupement carboxylique
Cr	Créatinine
CV	Coefficient de variation
Cys C	Cystatine C
DM	Diabète
E	Champs électrique
ESI	Electrospray
FG	Filtration glomérulaire
GFR	Glomerular filtration rate
HCLM	Hôpital Charles LeMoyne
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance (High Performance Liquid Chromatography)
HTA	Hypertension artérielle
IA	Intra-artérielle



IV	Intra-vasculaire
$K_{d\alpha}$	Constante de distribution alpha
$K_e$	Constante d'élimination
$K_{e\beta}$	Constante d'élimination bêta
LC	Chromatographie liquide
$L_d$	Longueur du capillaire jusqu'au détecteur
LLOD	Lowest limit of detection
LLOQ	Lowest limit of quantitation
$L_t$	Longueur total du capillaire
MDRD	Modification of the Diet in Renal Disease
MCAS	Maladie cardiaque athérosclérotique
MVAS	Maladie vasculaire athérosclérotique
MS	Spectromètre de masse (Mass spectrometry)
m/z	Masse sur charge
NAC	N-acétyl-cystéine
NESC	Néphropathie liée à l'exposition aux substances de contraste
OH	Groupe hydroxylique
p	Probabilité
PAH	Acide para-aminohippurique
pCr	Créatinine plasmatique
pCys C	Cystatine C plasmatique
PK-PD	Pharmacocinétique-pharmacodynamique

$Q_{in}$	Débit de la molécule à l'entrée d'un compartiment
QC	Quality control sample
$r$	Coefficient de pearson
$r^2$	Coefficient de détermination
RSD	Percent relative standard deviation
SC	Substance de contraste
$^{99}\text{Tc}^m\text{-DTPA}$	Technitium 99m-diéthylène triamine pentaacetic acid
TFG	Taux de filtration glomérulaire
Tof	Temps de vol (Time of flight)
$t_{1/2}$	Temps de demi-vie
$t_m$	Temps de migration
$\mu_{app}$	Mobilité apparente
$\mu_{eo}$	Mobilité électro-osmotique
$\mu_{ep}$	Mobilité électrophorétique
V	Voltage
$V_1$	Compartiment central
$V_2$	Compartiment périphérique
$V_{app}$	Volume apparent
$Y^+$	Premier groupe de sujets ( $\text{ClCrC} \geq 60 \text{ mL/min}$ )
$Y^-$	Deuxième groupe de sujets ( $\text{ClCrC} < 60 \text{ mL/min}$ )

# UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Clairance d'iohexol mesurée par LC-MS chez des sujets recevant une combinaison  
de substance de contraste iohexol-iodixanol

par

Marie-Claude Denis

Département des sciences de la santé communautaire

## RÉSUMÉ

En marge d'expériences actuelles visant à développer une méthodologie analytique sur la pharmacocinétique-pharmacodynamique de la N-acétyl-cystéine (NAC) en prévention de la néphropathie liée à l'exposition aux substances de contraste (NESC), une mesure de la clairance des substances de contraste a été mise au point comme marqueur de filtration glomérulaire (FG) étant donné que celles-ci sont totalement éliminées par FG. Ainsi, la mesure de la FG a été déterminée par la clairance de l'iohexol, substance de contraste utilisée en imagerie médicale. L'originalité de ce projet est triple : 1) mesurer la clairance de l'iohexol (Omnipaque) chez des patients recevant *également de* l'iodixanol (Visipaque), substance de contraste de plus en plus utilisée; 2) explorer la mesure de la clairance d'iodixanol et 3) utiliser la spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide, qui depuis les dernières années s'est taillée une place de plus en plus importante, pour le dosage de l'iohexol et de l'iodixanol. Le projet actuel s'est déroulé chez 17 sujets avec divers niveaux de fonction rénale devant subir des examens d'imagerie avec des substances de contraste. Une dose-traceur d'iohexol (5 ml) a été co-administrée avec l'iodixanol (environ 95 ml). Des spécimens sanguins ont été obtenus 0, 1, 2, 3, 4, 8 et 24 heures post-imagerie pour mesurer les clairances de l'iohexol et de l'iodixanol. Le comportement des autres marqueurs conventionnels de FG, soit le taux créatinine plasmatique et la clairance de la créatinine, ainsi que la clairance de la cystatine C et la clairance d'iodixanol ont été comparés à la clairance d'iohexol. Par conséquent, un protocole scientifique par HPLC-MSD Tof a été développé afin de séparer et de

quantifier les molécules iohexol et iodixanol co-administrées dans le plasma des sujets. Les mesures des taux plasmatiques de ces deux molécules ont permis de déterminer par des calculs pharmacocinétiques que la clairance de l'iohexol discrimine bien la fonction rénale des sujets avec une fonction rénale normale de ceux avec une fonction rénale diminuée. De plus, il a été démontré qu'une seule mesure post-4 heures est suffisante pour diagnostiquer l'état de la fonction rénale d'un patient qui a subi une intervention demandant une exposition aux substances de contraste. Les corrélations entre la clairance de l'iohexol et d'autres marqueurs conventionnels de FG ainsi que celle de l'iodixanol ont illustré que la clairance de la créatinine calculée soit par l'équation MDRD ( $r = 0,714$  et  $p = 0,001$ ) ou par Cockcroft et Gault ( $r = 0,518$  et  $p = 0,033$ ) et la clairance de la cystatine C ( $r = 0,671$  et  $p = 0,003$ ) corrèlaient de manière significative avec l'étalon d'or, soit la clairance de l'iohexol. C'est pourquoi, il pourrait être possible de se fier à la mesure de la clairance de l'iohexol comme meilleur marqueur de FG afin de prévenir, de diagnostiquer et de traiter la NESC. De plus, des expériences scientifiques en recherche fondamentale pourront enfin être menées pour déterminer la relation pharmacodynamique-pharmacocinétique de la N-acétylcystéine dans la prévention de la NESC à l'aide de la mesure de la clairance de l'iohexol comme marqueur fiable de la FG. Enfin, les mécanismes d'action qui interviennent dans la NESC pourront être mieux évalués.

Mots clés : néphropathie, substance de contraste, taux de filtration glomérulaire, clairance, HPLC-MS;

contrast-induced nephropathy, contrast agents, glomerular filtration rate, clearance, HPLC-MS.

## **PREMIER CHAPITRE**

### **INTRODUCTION**

Parmi les problèmes de santé dont le fardeau pour la personne et la société est lourd, l'insuffisance rénale est devenue l'un des plus importants. Depuis quelques années, on met au point diverses modalités novatrices d'intervention visant à réduire son incidence. Avec l'usage croissant de substances de contraste iodées lors d'analyses d'examens par imagerie médicale, l'incidence de la dysfonction rénale transitoire ou permanente est à la hausse étant donné les effets néphrotoxiques de ces substances. C'est ce que l'on appelle la néphropathie liée à l'exposition aux substances de contraste (NESC). La NESC est très préoccupante car elle vient au troisième rang des causes d'hospitalisation en néphrologie (Rickli *et al.*, 2004). Malgré l'abondante littérature sur les facteurs de risques de la NESC et les interventions préventives possibles, la controverse persiste et plusieurs difficultés méthodologiques sont présentes. D'une part, les paramètres conventionnels d'estimation du taux de filtration glomérulaire (FG), tels la créatinine plasmatique et sa clairance, sont influencés par une série de facteurs et ne permettent pas d'identifier précisément les sujets à risque de NESC. D'autre part, l'exposition aux substances de contraste est très variable selon le type d'imagerie, les pratiques des radiologistes, le contexte particulier du patient. Mais, tous les patients reçoivent par voie systémique

une substance organique liée à des atomes d'iode, substance éliminée principalement par le rein.

Dans le but de contribuer à réduire l'incertitude qui touche maints aspects de la NESC, nous avons cherché à utiliser les substances de contraste (iohexol et iodixanol) comme marqueur potentiel de FG afin de trouver un marqueur plus valide et fiable du risque de NESC et également de la survenue d'une NESC.

Au départ, une des problématiques importantes que nous souhaitions examiner en détail était celle de la relation pharmacocinétique-pharmacodynamique (PK-PD) de la N-acétyl-cystéine (NAC) dans la prévention de la NESC. En effet, la NAC est utilisée largement pour cette indication. Cependant, et comme les résultats controversés sur les bénéfices de son usage le montrent, plusieurs étapes ont été escamotées; on ne connaît pratiquement rien de la PK-PD de la NAC. Donc, le plan initial était d'une part de mettre en œuvre un programme d'étude PK-PD de la NAC (relation dose-concentration dans le temps, proportionnalité dose-concentration, relation dose-réponse clinique) et d'autre part, de trouver une meilleure mesure de la FG donc de la NESC. Malheureusement, il nous a été impossible de mettre au point une méthodologie analytique pour la NAC. Par la suite, une étude clinique nous a indiqué que la mesure de la cystatine C plasmatique, test dont la popularité était à la hausse, ne s'avérait pas être un meilleur marqueur de la FG (annexe A). Dès lors l'idée est venue d'utiliser la substance de contraste iohexol comme marqueur de la FG et nous avons mis notre énergie à 1) établir une méthodologie analytique pour la

mesure de la concentration plasmatique de cette substance applicable dans le contexte complexe de l'imagerie médicale et 2) étudier son potentiel clinique dans un projet de démonstration.

Afin d'établir une méthodologie analytique pour mesurer l'iohexol et l'iodixanol et d'étudier leur potentiel clinique comme marqueur de filtration glomérulaire, des objectifs spécifiques ont été établis :

- Objectif 1 :

Établir un protocole scientifique qui permettra la séparation et la quantification des molécules iohexol et iodixanol dans le plasma par HPLC-MSD Tof.

- Objectif 2 :

- A) Mesurer la clairance d'iohexol;
- B) Explorer la mesure de la clairance d'iodixanol;
- C) Évaluer comment se comportent les autres marqueurs conventionnels de filtration glomérulaire et celui de la clairance d'iodixanol comparés à l'étalon d'or « clairance d'iohexol ».

Par ce faire, une revue de la littérature sera faite au deuxième chapitre afin de comprendre la problématique de la NESC, les marqueurs de FG, les méthodologies de mesure pertinentes et la pharmacocinétique de l'iohexol et de l'iodixanol. La présentation des autres chapitres est particulière étant donné les spécificités de l'étude car elle comporte une partie en sciences fondamentales et une partie clinique. La partie fondamentale préalable a permis de procéder ensuite à la partie clinique. Ainsi, les aspects relatifs à l'étude fondamentale seront toujours présentés en premier dans les chapitres suivants. La méthodologie utilisée pour la mise au point de la méthode analytique pour l'iohexol et l'iodixanol et pour l'étude clinique sera expliquée au troisième chapitre. Les résultats de la validation de la méthode analytique de la mesure de l'iohexol et de l'iodixanol ainsi que ceux obtenus auprès des sujets dans le cadre de l'étude clinique seront montrés dans le quatrième chapitre. Étant donné qu'un article sur cette étude a été soumis, le manuscrit de l'article est également inclus à ce quatrième chapitre. Le cinquième chapitre discutera de l'interprétation des résultats fondamentaux et cliniques obtenus, des problèmes rencontrés avec la méthode analytique, des forces, des limites de l'étude et des perspectives cliniques. Le dernier chapitre conclura ce mémoire.



## **DEUXIÈME CHAPITRE**

### **RECENSION DES ÉCRITS**

Afin de bien comprendre la problématique, la recension des écrits débute en expliquant l'utilisation des substances de contraste en imagerie médicale. La section 2 traite quant à elle de la NESC (pathophysiologie, molécules de substances de contraste et stratégies de prévention). Les différents marqueurs de filtration glomérulaire sont ensuite décrits à la section 3. Le contexte de l'utilisation des molécules iohexol et iodixanol en imagerie est évoqué à la section 4. Les méthodologies de mesure pertinentes aux objets de l'étude sont examinées par la suite à la section 5. Enfin, à la section 6, des notions de pharmacocinétiques concernant l'iohexol et l'iodixanol sont amenées afin de comprendre les résultats cliniques qui seront présentés au chapitre suivant.

#### **1. MISE EN CONTEXTE : IMAGERIE MÉDICALE**

L'imagerie médicale permet au radiologiste de poser un diagnostic ou d'exécuter une intervention souvent à l'aide de substances de contraste iodés, tels que l'iohexol et l'iodixanol, afin d'opacifier les veines, les artères et même certains organes (Frennby, 1996; Manninen *et al.*, 1999).

Radiographie

Angiographie

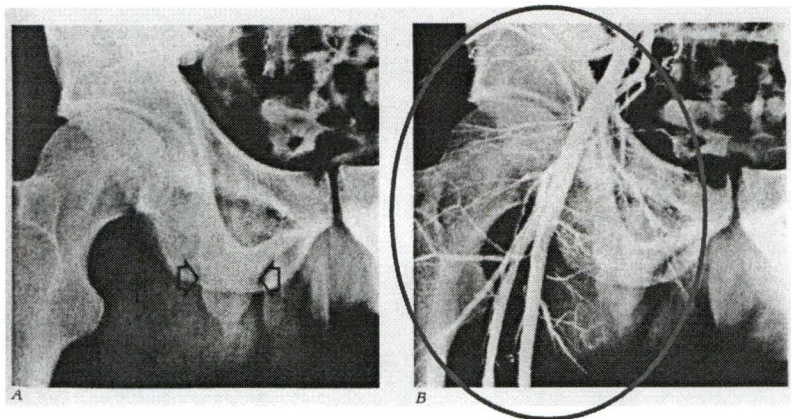


Figure 1 : Radiographies du bassin d'un sujet A) sans substance de contraste et B) avec injection de substance de contraste (reproduit avec la permission de l'Hôpital Charles LeMoine).

La figure 1 démontre deux radiographies du bassin d'un même sujet. Celle de gauche est une radiographie sans substance de contraste alors que celle de droite est une angiographie avec substance de contraste. L'angiographie (figure 1 B) permet au radiologiste de différencier le compartiment vasculaire du reste des organes.

Malheureusement, l'utilisation des substances de contraste en imagerie médicale peut causer certains inconvénients, tel que la NESC qui est de nature rénale (Andrew et Berg, 2004). La physiologie du rein est complexe et il ne s'agit pas dans ce présent mémoire de l'expliquer de manière exhaustive. Toutefois, la compréhension de la filtration glomérulaire est essentielle. On reconnaît une reproduction schématique du rein à la figure 2 avec ces différentes parties : cortex rénal, bassinnet, néphrons, artère rénale, veine rénale et l'uretère.

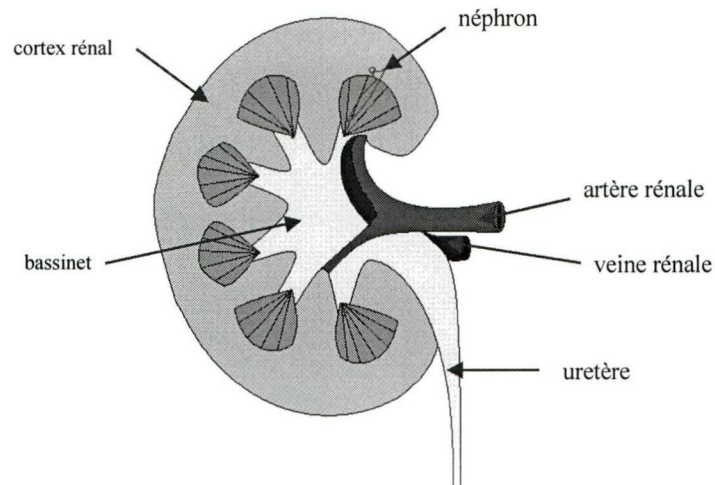


Figure 2: Coupe frontale du rein droit illustrant l'anatomie interne de ce dernier (inspiré de la référence Tortora *et al.*, 1999).

Lorsqu'un sujet est soumis à un examen en imagerie médicale avec une substance de contraste, l'élimination de la substance s'effectue par voie rénale : la substance va dans l'artère rénale jusqu'au glomérule (voir figure 3). Le glomérule va amorcer quant à lui la filtration de la substance de contraste. La filtration glomérulaire est réalisée par des échanges entre les tubules rénaux et les capillaires. Ainsi, on retrouve sensiblement la même concentration de substance de contraste dans le sang que dans l'urine.

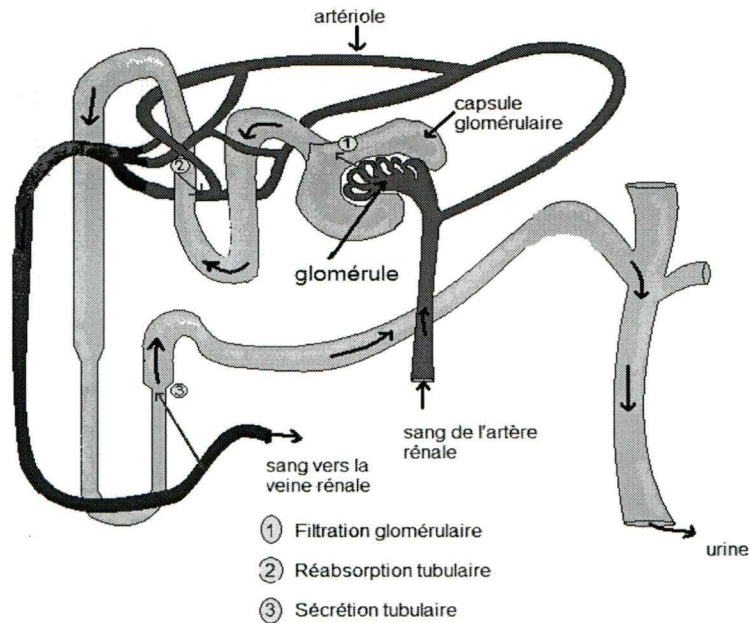


Figure 3 : Représentation schématique des fonctions du néphron (adapté de l'ouvrage de Tortora *et al.*, 1999).

## 2. Néphropathie liée à l'exposition aux substances de contraste

### 2.1 Pathophysiologie de la néphropathie liée à l'exposition aux substances de contraste

Depuis 1960, plusieurs équipes de recherche essaient par des études rétrospectives, méta-analyses ou encore par des études prospectives de comprendre la NESC et les mécanismes d'actions qui la sous-tendent. Plusieurs hypothèses sont suggérées et la définition de la NESC est de plus en plus large (Almén, 1994; Andrew et Berg, 2004; Aspelin *et al.*, 2003; Bakris *et al.*, 1990; Barrett et Parfrey, 1994; Bartley *et al.*, 1969; Brezis et Seymour,

1995; Detrenis *et al.*, 2005; Hizoh et Haller, 2002; Idée *et al.*, 2004; Katzberg, 2005; Morcos, 2005; Perlman *et al.*, 1997; Persson et Patzak, 2005; Pollman *et al.*, 1999; Rich et Crecelius, 1990; Solomon, 1998; Tepel *et al.*, 2006).

Les premières hypothèses plausibles définissent le mécanisme d'action de la NESC par une diminution du débit sanguin rénal lors de l'administration de substance de contraste. L'augmentation de la présence de médiateurs vasoconstricteurs (endothéline et adénosine) et la diminution d'oxyde nitrique, de prostaglandine et de quinines (substances vasodilatatrices) ont été reconnues, au courant des dernières années, ce qui appuie la notion de vasoconstriction, qui réduirait conséquemment le niveau du débit sanguin médullaire. À ce même moment, la substance de contraste provoque, par son effet osmotique, une diminution d'oxygène et une libération massive de sodium provenant du tubule médullaire. Afin de contrer cette libération de  $\text{Na}^+$ , l'anse de Henlé, tout en utilisant un apport massif d'oxygène, doit le réabsorber. Par contre, certaines études ont démontré que l'agent de contraste, en parallèle, pourrait largement diminuer l'apport d'oxygène par l'aggrégation de globules rouges. Ainsi, une demande massive d'oxygène suite à une faible production provoquerait une ischémie (Asif *et al.*, 2003; Barrett et Parfrey, 1994; Brezis et Seymour, 1995; Safirstein *et al.*, 2000;).

Le déploiement d'expériences avec des agents pharmacologiques pour contrecarrer la vasoconstriction ou cette ischémie (Idée *et al.*, 2004) a permis

d'entrevoir de nouvelles hypothèses : celles de la possibilité d'une atteinte directe sur les cellules rénales. Une prolongation de la présence de la substance de contraste induirait un effet toxique sur les cellules des tubules rénaux, tels que l'inhibition, la nécrose, l'apoptose, etc. (Heinrich *et al.*, 2005; Hizoh et Haller, 2002; Idée *et al.*, 2004; Perlman *et al.*, 1997; Pollman *et al.*, 1999). L'étude biochimique de ces voies a également permis de découvrir une nouvelle facette possible au mécanisme d'action de la NESC : les radicaux libres d'oxygène.

Suite à une synthèse des mécanismes possibles, une récente étude de 2005 suggère qu'il serait possible d'expliquer cette néphrotoxicité par trois mécanismes d'action (Katzberg, 2005): l'effet hémodynamique, la toxicité directe sur les cellules tubulaires rénales et la présence de radicaux libres.

L'effet hémodynamique peut s'expliquer par la notion de balance. En premier lieu, il y a une vasodilatation, habituellement, transitoire menant à la prolongation d'une hypotension systémique. Il est possible de corriger cette hypotension en hydratant le sujet ou en lui administrant des agents pharmacologiques qui permettront le retour du débit sanguin à la normale ainsi que son taux de filtration glomérulaire.

Quant à la toxicité directe sur les cellules tubulaires rénales, elle a pu être suggérée par la diminution de la clairance de l'acide para-aminohippurique (PAH) (Bäck, 1989). Cet acide a la même clairance que celle du débit plasmatique rénal. Par conséquent, la diminution de la clairance du PAH indique une réduction des cellules tubulaires sécrétrices des tubules proximaux des néphrons corticaux et est un indicateur indépendant des effets toxiques dus aux changements hémodynamiques ou osmotaires induits par la substance de contraste. La baisse de la concentration du PAH peut être causée par un effet d'hypertonie ou par une déshydratation. Si, auparavant un problème rénal existait, une prolongation de la présence de la substance de contraste dans la lumière tubulaire pourrait causer une hypovolémie secondaire ou une augmentation de la concentration de la substance de contraste chez le sujet déshydraté. Pour ce qui est des diabétiques, une diurèse osmotique pourrait également apparaître.

L'administration de substance de contraste peut également causer l'apparition de radicaux libres due à une diminution de l'activité de l'enzyme anti-oxydante « catalase superoxyde dismutase ». Les radicaux libres sont extrêmement néfastes pour les constituants cellulaires (Bakris *et al.*, 1990); ils peuvent causer un stress oxydatif et endommager les protéines. Deux solutions sont envisageables afin de diminuer ce mécanisme de NESC : une hydratation pré- et post-substance de contraste; et une administration de N-acétylcystéine (NAC) afin de réduire ce stress oxydatif, la NAC agirait au



même titre qu'un éboueur au niveaux des radicaux d'oxygène réactifs (Fishbane *et al.*, 2004; Tepel *et al.*, 2000).

## 2.2 Molécules de substances de contraste

Le type de substance de contraste (SC) et le volume administré peuvent jouer un rôle dans l'apparition de la NESC (Dawson, 1985; Tepel *et al.*, 2006). Il existe plusieurs types de SC, certaines d'entre elles sont plus utilisées que d'autres pour un type d'intervention. La tomодensitométrie et l'angiographie, deux types majeurs d'imagerie, utilisent principalement les produits de contraste suivants: iohexol et iodixanol (figure 4).

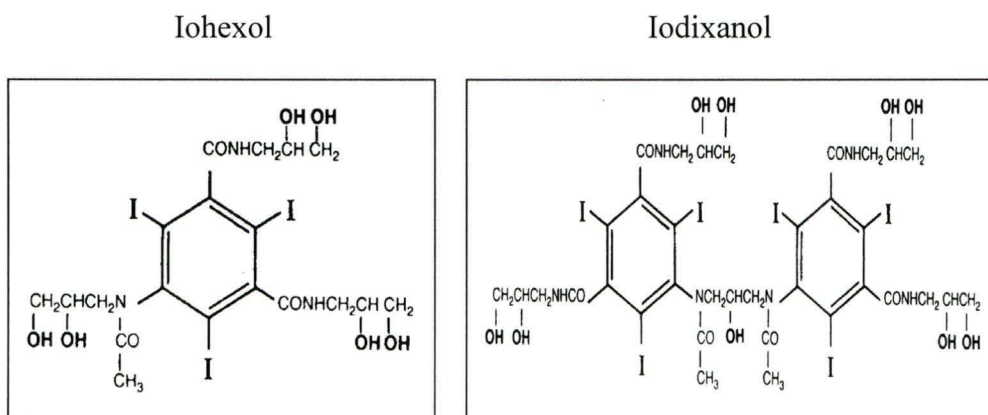


Figure 4 : Structures chimiques des molécules iohexol et iodixanol.

Afin de bien comprendre le rôle que peut jouer le type de SC dans l'apparition de la NESC, la recension des écrits a été faite sur les différences physico-chimiques de l'iohexol et de l'iodixanol. Avant de comparer les différences physico-chimiques de ces deux produits de contraste, il est important d'expliquer que l'iohexol est de moins en moins utilisé en milieu



hospitalier à cause des sensations de douleur et de chaleur qu'éprouvent les sujets au site même de l'injection (Albrechtsson *et al.*, 1992; Eivindvik et Sjogren, 1995). De plus, l'iodixanol offre une meilleure qualité d'image aux radiologistes pendant leurs interventions à un plus petit volume que l'iohexol.

Ioexol (N, N '-bis(2,3-dihydroxypropyl) 5-[N-(2,3-dihydroxypropyl)-acetamido]-2,4,6-triiodo-isophthalamide) est un monomère non-ionique tri-iodé (3 atomes d'iode/ molécule) de poids moléculaire de 821,8 Da (figure 4) (Almén, 1994; Fountaine *et al.*, 1996; Michelet, 1987; McClennan et Stolberg, 1991). L'iohexol est une molécule de faible osmolarité comparativement à l'iodixanol qui est iso-osmolaire. L'iodixanol 5,5 '-((2-Hydroxy-1,3-propanediyl) – bis(acetylimino)) bis(N, N '-bis(2,3-dihydroxypropyl) 2,4,6 triiodo-1, 3-benzenedicarboxamide) est un dimère non-ionique hexa-iodé (6 atomes d'iode / molécule) de poids moléculaire de 1550,7 Da (figure 4) (Almén, 1994; Stolberg et McClennan, 1991). L'iodixanol est obtenu par synthèse sous la forme d'un mélange de plusieurs rotamères : endo-endo, exo-endo et exo-exo (Jacobsen, 2000). Il est important de mentionner que dans les conditions chromatographiques utilisées à la section 2.4.1 du quatrième chapitre, les isomères exo-exo et exo-endo co-éluent pendant que endo-endo et endo-exo co-éluent à leur tour.

Les effets néfastes des substances de contraste dépendent d'au moins quatre facteurs (Almén, 1994; Cox et Tsikouris, 2004; Heinrich *et al.*, 2005;

McClennan et Stolberg, 1991): la chimiotoxicité intrinsèque des molécules, l'osmolarité, la toxicité ionique et la dose de la solution qui les contient. Les premières molécules de produits de contraste sont apparues vers les années 1950. Les produits de cette première génération sont tri-iodés et ioniques. Le sel est soit du sodium, soit de la méglumine ou plus rarement de la monoéthanolamine. En solution, les sels se dissocient et les groupements restant sur la molécule sont des groupements carboxyliques. La preuve que ces groupements ioniques étaient toxiques pour la cellule a été démontrée à la fin des années 1960. En 1968, Almén a solutionné le problème de toxicité ionique avec la création des substances de contraste non-ionique. Les groupements carboxyliques (COO-) sur les molécules de substances de contraste ont été remplacés par des groupements hydroxyliques (OH), ce qui crée l'apparition de la deuxième génération de substances de contraste. Plus tard, la différence de 3 groupes d'hydroxyles a fait en sorte que la troisième génération de substances de contraste, tel que l'iodixanol (Visipaque<sup>MD</sup>), est moins chimiotoxique que l'iohexol (Omnipaque<sup>MD</sup>) (Almén, 1994). Plus le nombre de OH est élevé sur une molécule plus elle est soluble dans l'organisme et plus elle se distribue rapidement. Quant à l'osmolarité, les substances de contraste sont divisées en trois catégories : hyper-osmolaire (1000 à 2 000 mOsm/kg), faiblement osmolaire (de 500 à 1 000 mOsm/kg) et iso-osmolaire (290 à 300 mOsm/kg). Les substances de contraste iso-osmolaires sont moins néphrotoxiques car elles se rapprochent de l'osmolarité de l'organisme humain, qui est d'environ 300 mOsm/kg. Il est également

possible d'évaluer l'osmolarité des substances de contraste par le ratio du nombre de leurs groupements OH par atome d'iode pour une molécule. L'iohexol a un ratio de 2, soit de 6 OH : 3 atomes d'iode par molécule alors que l'iodixanol a un ratio de 1.5, soit de 9 OH : 6 atomes d'iode par molécule. Ainsi, plus le ratio nombre de OH/ atomes d'iode pour une molécule est bas, moins la molécule a un potentiel néphrotoxique (Dawson et Howell, 1986). De plus, quelques études cliniques suggèrent que la NESC se développerait moins chez les sujets à haut risque lorsque l'iodixanol (300 mOsm/kg) est utilisé plutôt que l'iohexol, qui est de faible osmolarité non-ionique (780-800 mOsm/kg) (Aspelin *et al.*, 2003; Chalmers et Jackson, 1999; McCullough *et al.*, 2006). Pour ce qui est du facteur de la dose, il est recommandé d'utiliser un faible volume de substance de contraste iso-osmolaire (inférieur à 140 mL) (Briguori *et al.*, 2002); plus le volume de substance de contraste est élevé plus sa présence est longue dans l'organisme et plus il peut causer des dommages rénaux. Donc, la substance de contraste idéale serait non-ionique, très soluble avec une osmolarité se rapprochant de celle des cellules humaines et nécessiterait une faible dose.

## 2.3 Stratégies de prévention de la néphropathie liée à l'exposition aux substances de contraste

### 2.3.1 *Hydratation saline*

L'hydratation est communément pratiquée afin de prévenir, suite à une administration de SC, le déclin du taux de filtration glomérulaire (TFG) (Andrew et Berg, 2004; Oudemans-Van Straaten, 2004). Encore aujourd'hui, deux types de solutés sont employés principalement dans le milieu hospitalier: le dextrose 5 % NaCl à 0,45 % ou du NaCl 0,9 %. La solution saline isotonique (0,9 %) est recommandée (Mueller *et al.*, 2002), toutefois le débat quant au choix du type de soluté n'est pas encore résolu (Tepel *et al.*, 2006). Il n'y a pas seulement le choix de la concentration de la solution saline qui peut paraître difficile pour le spécialiste; le choix du protocole d'hydratation est également source de questionnement, deux méthodes d'hydratation sont présentement utilisées : l'hydratation intraveineuse pré-examen et l'administration en bolus pendant la procédure. L'étude de Bader a révélé que l'incidence d'une NESC était relativement faible chez les sujets pré-hydratés avec une fonction rénale normale (5,3 %) à comparativement au groupe qui a reçu une hydratation en bolus (300 mL) donné durant l'intervention (15 %) (Bader *et al.*, 2004). On s'entend aujourd'hui (Mueller *et al.*, 2002) pour dire que l'hydratation est primordiale afin de protéger le sujet contre la NESC, plus

particulièrement une hydratation avec du normal salin pendant 12 heures pré/post-administration d'agent de contraste iodé. Cependant, dans le contexte d'examens souvent faits sur une base externe ou ambulatoire, cette pré-hydratation s'avère difficile à instaurer. Quoiqu'il en soit, plusieurs études cliniques démontrent que même avec une substance de contraste iso-osmolaire, telle que l'iodixanol, et une pré-hydratation de 12 heures, la protection reste quand même limitée (Cox et Tsikouris, 2004). Plusieurs scénarios alternatifs à celui de l'hydratation de 12 heures ont été testés afin soit d'offrir une protection supplémentaire contre la NESC, soit de pallier à un protocole d'hydratation trop bref ou à l'un des autres mécanismes d'action qui causent la NESC. Par exemple, les produits suivants ont été testés cliniquement: théophylline (Solomon *et al.*, 1994), furosemide (Elliott et Simon, 1990; Solomon *et al.*, 1994), dopamine (Idée *et al.*, 2004; Maeder *et al.*, 2004), mannitol (Maeder *et al.*, 2004; Solomon *et al.*, 1994), fenoldopamine (Diaz-Sandoval *et al.*, 2002; Lepor, 2003), adenosine (Albrechtsson *et al.*, 1992), bloqueurs de canaux calciques (Briguori *et al.*, 2004; Kurnik *et al.*, 1990) et facteur natriurétique de l'oreillette (Abizai *et al.*, 1999). Malheureusement, aucune de ces molécules n'a permis de procurer aux sujets une protection supplémentaire contre la NESC à celle d'une simple hydratation pré et post-examen de 12 heures (Maeder *et al.*, 2004). Plus récemment, une hydratation intraveineuse avec du bicarbonate de

sodium 1 heure avant l'exposition au produit de contraste et 6 heures post a été recommandée (Merten *et al.*, 2004). Selon l'article de l'équipe de Merten, le remplacement du protocole d'hydratation au chlorure de sodium pré/post-examen de 12 heures par une hydratation d'une heure pré-examen et post-6 heures au bicarbonate de sodium offrirait une meilleure protection aux sujets en étant de plus courte durée (Merten *et al.*, 2004). Ces données doivent cependant être validées avec un échantillon de sujets plus grand et diversifié (incluant des sujets avec des facteurs de co-morbidité, tels que le diabète, l'hypertension artérielle, maladie vasculaire ou cardiaque, etc.). Car, l'étude de Merten a été réalisée sur 119 sujets dont l'un des deux groupes (n = 59 sujets) recevait du NaCl alors que le deuxième groupe (n = 60 sujets) du bicarbonate de sodium. Les sujets qui ont été recrutés devaient répondre uniquement aux critères d'inclusion suivants: être âgé de plus de 18 ans, une créatinine sérique normale et devant passer un examen d'imagerie médicale avec exposition aux substances de contraste.

### 2.3.2 *N-acétylcystéine*

La N-acétylcystéine (NAC) est depuis longtemps utilisée par voie intraveineuse comme antioxydant afin de contrer la toxicité hépatique de l'acétaminophène pris en surdose (Goldenberg *et al.*,

2004). En 2000, Tepel *et al.* rapportent pour la première fois que l'administration orale (600 mg deux fois par jour la veille et le jour de l'imagerie) est supérieure au placebo pour réduire la survenue de la NESC chez des sujets ayant de plus reçu une hydratation de base avec NaCl 0,9 % (12 h avant et 12 h après exposition à la substance de contraste) (Tepel *et al.*, 2000). Ce protocole est devenu rapidement une pratique courante. Malgré les différentes hypothèses concernant les effets positifs de la NAC, l'action anti-oxidante médiée par sa capacité de mimer l'action de la glutathion-réductase grâce à son groupement thiol (Fishbane *et al.*, 2004; Safirstein *et al.*, 2000) reste la plus citée. Jusqu'à maintenant, on connaît peu sur les cellules effectrices, les récepteurs, les médiateurs intracellulaires, ou autres qui joueraient un rôle possible dans les effets réno-protecteurs de la NAC. Une étude fondamentale d'il y a plus de 10 ans (Cotgreave *et al.*, 1991) indiquait par ailleurs que la cellule endothéliale épuisée de glutathion serait extrêmement sensible aux métabolites réactifs oxydatifs, qui causent malheureusement de nombreux dommages cellulaires et membranaires touchant par le fait même de nombreux organes, tel que le rein. L'ajout de NAC re-stimulerait la synthèse de glutathion cellulaire. Même si le processus d'épuisement de glutathion cellulaire serait en cours, l'addition de NAC aux cellules permettrait du moins le retardement du processus d'épuisement. Même en acceptant l'hypothèse du bienfait de la NAC en prévention de NESC, ce qui est souvent contesté vu les

essais cliniques avec résultats négatifs, il reste de nombreux aspects à clarifier. Quels sous-groupes de sujets devraient recevoir la NAC (Alonso *et al.*, 2004; Asif *et al.*, 2003; Billinger *et al.*, 2004; Boccalandro *et al.*, 2003; Briguori *et al.*, 2004; Cox et Tsikouris, 2004; Fung *et al.*, 2004; Tepel *et al.*, 2000) ? Quelle est la dose optimale (Durham *et al.*, 2002; Briguori *et al.*, 2004; Marenzi *et al.*, 2006) ? Quel est le meilleur moment pour l'administrer ? La NAC est-elle efficace si l'hydratation est incomplète (comme en contexte ambulatoire) ?

### *2.3.3 Prévention de la néphropathie liée à l'exposition aux substances de contraste dans le contexte des soins ambulatoires*

Depuis quelques années, les sujets non hospitalisés et devant passer un examen d'angiographie, avec ou sans angioplastie, et exposés aux substances de contraste sont préparés par une unité de soins que l'on nomme les soins ambulatoires. Après intervention, le sujet est gardé sous observation pendant quelques heures à cette unité.

Au mieux le sujet reçoit 1 à 3 heures d'hydratation intraveineuse pré-angiographie et environ 4 heures additionnelles en post-intervention. On suggère au sujet de bien s'hydrater per os la veille de l'examen. Vu l'hydratation sous-optimale liée à ce contexte



ambulatoire, la NAC est fréquemment prescrite même si son efficacité dans ce contexte particulier n'a pas été évaluée. On ne peut être certain de l'observance du sujet pour l'hydratation à la maison de même que pour la prise de NAC la veille de l'examen.

### 3. MARQUEURS DE FILTRATION GLOMÉRULAIRE

Après cette mise en contexte, une synthèse sur les marqueurs de FG, leurs avantages et inconvénients est présentée. Plus loin, un nouvel outil permettant d'identifier le risque et la survenue de la NESC sera examiné.

#### 3.1 Taux de créatinine sérique et sa clairance

Le marqueur conventionnel actuel de la fonction rénale est sans contredit la mesure de la créatinine plasmatique (Hoffmann *et al.*, 2004; McCullough, 2003). La créatinine est le produit du catabolisme de la créatine phosphate dans les muscles squelettiques. Le niveau normal de créatinine dans le sang varie de 45 à 110  $\mu\text{mol/L}$ . La créatinine plasmatique s'élève lorsque la FG diminue mais le niveau de créatinine est aussi fonction de l'âge et de la masse musculaire, ce qui complique son utilisation comme marqueur de FG (Massey, 2004). Dans le cas de la NESC, on considère qu'une augmentation de la créatinine supérieure à 25 % révèle sa survenue (Barrett et Parfrey, 1994; Hoffman *et al.*, 2004; McCullough, 2003; Solomon, 1998).

Une deuxième façon d'évaluer la FG par la mesure de la créatinine est sa clairance (Lin et Bonventre, 2005; Massey, 2004 et Solomon, 1998). Il est possible d'obtenir la clairance de la créatinine de deux façons : mesurée (ClCrM) ou calculée (ClCrC) à l'aide d'équations. La ClCrM a été évaluée selon l'équation usuelle UV/P où UV représente la quantité (μmole/min) de créatinine urinaire dans un échantillon de 24 h, et P, la concentration de pCr (μmole/mL) (Massey, 2004). Toutefois, une collecte urinaire de 24 heures est difficilement réalisable autant pour le sujet que pour le personnel soignant. L'avenue de la ClCrC est intéressante. Il est possible de la calculer par l'une ou l'autre des équations suivantes : équation Cockcroft et Gault (Cockcroft et Gault, 1976) ou équation MDRD (Harmoinen *et al.*, 2003; Hortin, 2006; Levey *et al.*, 1999). L'équation Cockcroft et Gault calcule la ClCrC comme suit :

$$ClCrC = \frac{(140 - \text{âge (années)}) \times \text{poids (kg)}}{\text{créatinine sérique } (\mu\text{mol/L}) \times 0,80} \quad \text{éq.(1)}.$$

Chez la femme le résultat de la formule est multiplié par un facteur de 0,85 (Rickli *et al.*, 2004), afin de compenser pour la différence de masse musculaire d'avec les hommes. Alors que l'équation MDRD calcule la ClCrC comme suit :

$$ClCrC = 186 \times (\text{créatinine sérique (mg/dL)})^{-1,154} \times \text{âge (années)}^{-0,203} \quad \text{éq.(2)}.$$

Cette dernière équation a été conçue pour un individu caucasien âgé de 18 ans ou plus et dont l'aire de la surface corporelle moyenne est de  $1,73 \text{ m}^2$ . Ainsi, la ClCrC par MDRD est exprimée en  $\text{mL/min}/1,73 \text{ m}^2$  (Frennby et Sterner, 2002). Il est également possible d'utiliser cette équation pour un résultat de créatinine sérique exprimé en  $\mu\text{mol/L}$ , il suffit de le diviser par un facteur de 88,4 (Hortin, 2006). Chez la femme le résultat de la formule est multiplié par un facteur de 0,742 afin de compenser la différence de masse musculaire avec celle des hommes. Si l'individu est un africain, le résultat est multiplié par un facteur de 1,210.

On considère que l'insuffisance rénale commence lorsque la clairance de créatinine est inférieure à  $60 \text{ mL/min}$  (McCullough *et al.*, 1997; Morcos *et al.*, 1999; Thomsen et Morcos, 2003).

### 3.2 Clairance de l'inuline

L'inuline est un polysaccharide exogène, de poids moléculaire de 5200 Da, filtré par la membrane du glomérule, sans être sécrété ni réabsorbé par les tubules rénaux (Brown et O'Reilly, 1991). C'est un marqueur rénal extrêmement fiable selon la littérature, il est considéré comme la mesure étalon de la fonction rénale car il se filtre aussi bien que de l'eau (Brown et O'Reilly, 1991; Gaspari *et al.*, 1995). Sa mesure est toutefois peu réalisable due (1) à sa perfusion qui doit être maintenue de façon continue pendant

quelques heures afin de maintenir sa concentration sanguine constante (Frennby, 1996), (2) à une méthodologie analytique peu répandue et (3) à la difficulté d'obtenir de l'inuline (Frennby et Sterner, 2002). Une deuxième perfusion d'une solution d'un polyalcool, le mannitol, est également recommandée simultanément à celle de l'inuline afin de s'assurer qu'une diurèse osmotique permettra de recueillir suffisamment d'urine. Puisque l'inuline est uniquement filtrée par le glomérule et que sa présence dans les tubules est en quantité importante, une augmentation de la pression osmotique des liquides intra-tubulaires est provoquée empêchant la réabsorption de l'eau. C'est pour cette raison que le mannitol doit être perfusé en même temps que l'inuline. Bref, l'usage de l'inuline pour estimer la FG est trop complexe et pratiquement abandonné.

### 3.3 Clairance du $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -DTPA

Le « technitium 99m-diéthylène triamine pentaacetic acid » ( $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -DTPA) est utilisé comme traceur pour la scintigraphie rénale dynamique en imagerie nucléaire depuis 1970. Il s'agit d'un agent chélaté métallique que l'on administre par voie intraveineuse. Il est éliminé principalement par filtration glomérulaire, sans sécrétion ni réabsorption (Brown and O'Reilly, 1991). Toutefois, il est faiblement lié aux protéines plasmatiques (1-10%) et son excrétion extra-rénale demeure négligeable (Effersøe *et al.*, 1990). Son utilisation comme marqueur de FG a le désavantage d'exposer, par contre, le



Connue également sous le nom de  $\gamma$ -trace et post- $\gamma$ -globuline, la cystatine C traverse aisément la membrane glomérulaire grâce à son faible poids moléculaire ainsi que sa charge positive (Simonsen *et al.*, 1985). Elle n'est pas sécrétée par les cellules épithéliales du tubule proximal rénal comme la créatinine mais elle est plutôt réabsorbée par celles-ci (Schuck *et al.*, 2004). Une fois que la cystatine C est réabsorbée, elle est catabolisée par les cellules épithéliales du tubule proximal sans retourner dans le système sanguin (Massey, 2004).

L'élévation des taux plasmatiques de cystatine C corrèle avec une diminution de FG (Page *et al.*, 2000), on a alors suggéré qu'ils pourraient être plus fiables que la créatinine, de même que d'autres protéines de faible poids moléculaire comme la  $\beta_2$ -microglobuline (Delanaye *et al.*, 2004; Dharnidharka *et al.*, 2002; Simonsen *et al.*, 1985). Vu son indépendance à plusieurs facteurs, dont la masse musculaire, l'âge et le sexe du sujet, la cystatine C aurait le potentiel d'être un meilleur marqueur endogène que la créatinine (Bökenkamp *et al.*, 1998; Löfberg *et al.*, 1980; Norlund *et al.*, 1997). Une seule mesure sérique serait suffisante afin de déterminer tous les paramètres nécessaires au diagnostic du niveau de la fonction rénale (Rickli *et al.*, 2004).

Cependant, la fiabilité de ce marqueur prometteur est déjà mis en doute (Grubb *et al.*, 2005; Harmoinen *et al.*, 2003; Knight *et al.*, 2004; Page *et al.*,

2000; Vinge *et al.*, 1999). Dans des travaux préliminaires, nous avons aussi remarqué chez 106 sujets et volontaires sains que la cystatine C était élevée dans le plasma lorsque la FG était réduite mais que la relation n'était pas linéaire (annexe A).

### 3.5 Clairance de l'iohexol

L'iohexol est une molécule exogène qui doit être injectée par voie intraveineuse ou intra-artérielle. Elle est utilisée depuis longtemps comme substance de contraste en imagerie médicale, tel que discuté à la section 2.2. On a découvert par hasard que l'on pouvait estimer la FG à l'aide de l'iohexol dont l'élimination est essentiellement rénale (Krutzen, 1984). L'iohexol est facile à obtenir commercialement et n'est pas radioactive (Frennby, 1996). La molécule est non-métabolisée (Aakhus *et al.*, 1980; Aakhus *et al.*, 1983; Frennby, 1996), et n'a aucun organe cible. Sa répartition répond uniquement à un simple gradient de concentration molaire de part et d'autre des capillaires (Frennby, 1996). Il y a absence de passage intra-cellulaire significatif en absence de lésion membranaire (Erley *et al.*, 2001; Frennby, 1996). Elle est donc éliminée par simple filtration glomérulaire sans sécrétion ni réabsorption, ce qui fait de l'iohexol un étalon d'or tel que défini que l'équipe de Krutzen en 1984 (Frennby, 1996; Krutzen, 1984). Sa clairance est calculée à partir de mesures en série de taux plasmatiques d'iohexol faits à l'intérieur de 24 heures (Frennby,

1996) et du calcul subséquent de la constante d'élimination en appliquant une analyse cinétique de base.

### 3.6 Clairance de l'iodixanol

L'iodixanol est une autre molécule exogène, utilisée comme substance de contraste, au même titre que l'iohexol; comme l'iohexol, elle a des caractéristiques cinétiques simples et est éliminée par FG (Svaland *et al.*, 2002). Par contre, plusieurs problèmes méthodologiques d'analyse font de sa mesure plasmatique un défi de taille jusqu'à récemment. Le développement en 2000 d'une méthode analytique fiable, robuste et simple en chromatographie liquide à haute performance (HPLC) a permis de mesurer l'iodixanol plasmatique (Jacobsen *et al.*, 1999). Sa clairance peut être calculée par des mesures en série de taux plasmatiques d'iodixanol (Frennby et Sterner, 2002).

## 4. UTILISATION DE L'IOHEXOL ET DE L'IODIXANOL EN IMAGERIE : CONSIDÉRATIONS IMPORTANTES POUR L'APPLICATION CLINIQUE D'UNE ÉVENTUELLE MESURE DE LEUR CLAIRANCE.

L'iohexol, reconnu comme étalon d'or de la mesure de FG, perd sa popularité comme SC en imagerie aux dépens d'autres molécules comme l'iodixanol, vu son potentiel néphrotoxique. Comme la clairance de l'iodixanol est mesurable (c.f. 3.6), l'iodixanol pourrait être utilisé comme marqueur de FG.



Cependant, l'administration variable et en plusieurs séquences de l'iodixanol rend l'interprétation de sa cinétique plus difficile pour permettre une évaluation fiable de la FG. À première vue, ces considérations relatives à l'iohexol et l'iodixanol limitent le potentiel d'utilisation de chacune de ces molécules comme marqueurs fiables et pertinents de la FG.

Toutefois, ces deux obstacles nous ont amené à proposer une innovation à la fois méthodologique et clinique, l'objet de cette maîtrise. Il s'agit de l'administration concomitante de l'iohexol et de l'iodixanol chez un sujet. Cette co-administration devenait un défi important étant donné que notre capacité à mesurer l'iohexol et l'iodixanol séparément dans le plasma était pratiquement impossible avec des instruments d'analyse de routine.

## 5. MÉTHODOLOGIES ANALYTIQUES PERTINENTES

Afin de répondre à l'objectif 2, qui était de mesurer la clairance de l'iohexol, la clairance de l'iodixanol et de comparer les comportements des autres marqueurs de FG à celui de l'iohexol, quatre méthodes analytiques différentes ont dû être utilisées. Les méthodes reliées à la mesure de la créatinine et de la cystatine C plasmatiques sont tout d'abord présentées, puis celles à envisager pour la mesure de l'iohexol et de l'iodixanol.

## 5.1 Mesure de la créatinine et de la cystatine C plasmatiques

La mesure de la créatinine plasmatique est conventionnelle et automatisée. C'est la méthode dite de Jaffé en cinétique compensée (Blass *et al.*, 1974; Hearne, 1979; Lustgarten et Wenk, 1972; Masson *et al.*, 1981; Taussky, 1956). Les échantillons cliniques pour sa mesure dont il sera question plus loin ont été simplement soumis au multianalyseur de notre institution.

Pour la cystatine C plasmatique, on utilise un immunoassay classique, assuré à la détection par turbidimétrie ou néphélométrie (Blirup-Jensen, 2001; Kyhse-Andersen *et al.*, 1994; Mussap *et al.*, 1998). Un projet pilote, qui a été fait auparavant, a permis d'implanter une procédure automatisée pour la mesure de la cystatine C pour ce projet (annexe A).

## 5.2 Mesure de l'iohexol et de l'iodixanol

Avant de mettre au point la méthodologie innovatrice pour la mesure de l'iohexol et de l'iodixanol par *HPLC-MSD Tof*, nous avons testé une méthodologie analytique potentielle par électrophorèse capillaire. Ces développements méthodologiques ont requis beaucoup d'astuces et d'expertises, et nécessitent une mise en contexte plus fondamentale, mais néanmoins importante pour ce projet et pour ceux et celles qui décideront de

reprendre ce travail pour continuer à faire avancer les connaissances. Par conséquent, les sections concernant la théorie, la méthodologie, les résultats, la discussion et la conclusion par électrophorèse capillaire seront présentés dans ce mémoire avant ceux par *HPLC-MSD Tof*.

### 5.2.1 *Électrophorèse capillaire*

L'électrophorèse capillaire (CE, capillary electrophoresis) est une méthode de séparation basée sur les différences entre les mobilités électrophorétiques des espèces à analyser (Rouessac et Rouessac, 2004). Le faible diamètre du tube capillaire permet de bien dissiper la chaleur et rend donc possible l'utilisation des champs électriques élevés pouvant atteindre 30 kV (Voet et Voet, 2002). Les éléments de base d'un système d'électrophorèse capillaire sont représentés sur la figure 6.

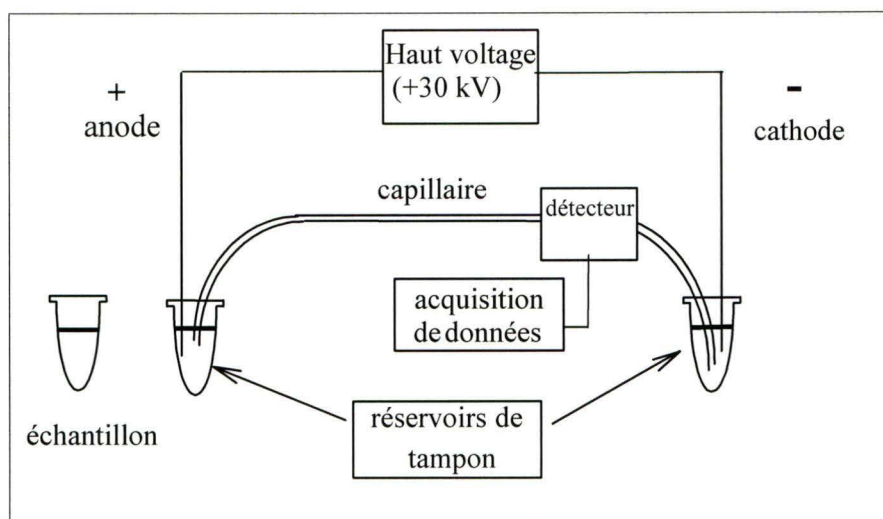


Figure 6 : Schéma représentant un système d'électrophorèse capillaire (adapté de l'ouvrage de Rouessac et Rouessac, 2004).

En électrophorèse capillaire en solution libre, deux phénomènes coexistent et sont responsables du déplacement des analytes: l'électro-osmose, qui est l'écoulement du solvant suite au potentiel zêta ( $\zeta$ ) qui se forme à la surface de contact entre la silice et une solution tampon et l'électrophorèse, représentée par le déplacement des espèces chargées sous l'influence d'un champ électrique (Rouessac et Rouessac, 2004).

Au contact d'une solution aqueuse, certains groupements silanols (Si-OH) du capillaire sont ionisés et confèrent à la surface de la silice une charge négative. La paroi chargée négativement attire les ions positifs du tampon, créant une double couche électrique. Lorsqu'on applique un voltage sur la longueur du capillaire, les

cations se trouvant dans la couche diffuse de cette double couche migrent vers l'électrode de charge opposée et entraînent les molécules de solvant avec eux. Il en résulte un flux de solvant appelé flux électro-osmotique et caractérisé par la mobilité électro-osmotique:

$$\mu_{eo} = \frac{\varepsilon \zeta}{4\pi\eta}$$

où  $\zeta$  est le potentiel zêta,  $\varepsilon$  est la constante diélectrique et  $\eta$  est la viscosité du milieu (Rouessac et Rouessac, 2004). Toute condition expérimentale susceptible d'affecter les paramètres plus haut mentionnés (pH, force ionique du tampon, température) a une répercussion directe sur le flux électro-osmotique.

La mobilité électrophorétique ( $\mu_{ep}$ ) caractérise le déplacement des analytes chargés dans un électrolyte, sous l'influence d'un champ électrique :

$$\mu_{ep} = \frac{q}{6\pi\eta r}$$

où  $q$  est la charge et  $r$  est le rayon hydrodynamique de l'espèce à analyser (Rouessac et Rouessac, 2004). La différence entre les rapports  $q/r$  des différents analytes est responsable de leur migration sélective et donc de la séparation par électrophorèse capillaire.

En électrophorèse capillaire en solution libre, la mobilité apparente ( $\mu_{app}$ ) est la somme des deux contributions décrites précédemment :

$$\mu_{app} = \mu_{éo} + \mu_{ép}$$

Les espèces positivement chargées sont les premières à atteindre le détecteur, situé du côté de la cathode, car dans leur cas, les deux contributions s'additionnent. Les neutres migrent tous à la vitesse du flux électro-osmotique. Les espèces négativement chargées, attirées par l'anode, sont ralenties dans leur avancement et sont les dernières à se rendre au détecteur.

La vitesse apparente d'un analyte chargé ( $v_{app}$ ) est donnée par :

$$v_{app} = v_{éo} + v_{ép} = \mu_{app} E = (\mu_{éo} + \mu_{ép}) E$$

où  $E$  est le champ électrique appliqué (Rouessac et Rouessac, 2004).

La vitesse apparente est cependant un paramètre accessible expérimentalement :

$$v_{app} = \frac{L_d}{t_m} \text{ et } E = \frac{V}{L_t}$$

où  $L_d$  est la longueur du capillaire jusqu'au détecteur (cm),  $t_m$  est le temps de migration (s),  $V$  est le voltage appliqué (V) et  $L_t$  la longueur

totale du capillaire (cm). Le temps de migration d'une espèce est donc donné par :

$$t_m = \frac{L_d}{v_{app}} = \frac{L_d L_t}{(\mu_{eo} + \mu_{ep})V}$$

On peut calculer la mobilité électro-osmotique à partir du temps de migration d'une espèce neutre.

Le développement d'une méthode en CE commence par le choix du pH du tampon car il influence d'une part le degré d'ionisation des silanols donc le flux électro-osmotique et d'autre part la charge de l'analyte, donc la mobilité électrophorétique de l'espèce. La nature et la concentration du tampon ainsi que le voltage appliqué sont ajustés par la suite.

### 5.2.2 HPLC-MSD Tof

La chromatographie liquide est une technique par laquelle les analytes d'un mélange sont séparés selon un ordre d'élution donné par leur distribution entre deux phases non miscibles (figure 7). La phase dite stationnaire est un solide finement divisé, immobilisé dans une colonne. La phase mobile, composée habituellement d'un mélange de solvants organiques ou aqueux, se déplace à travers la phase stationnaire permettant l'élution des analytes du mélange de la colonne

(Rouessac et Rouessac, 2004; Voet et Voet, 2002). En chromatographie liquide à haute performance (High Performance Liquid Chromatography (HPLC)), la phase stationnaire est constituée de microparticules sphériques de diamètres compris entre 2 et 5  $\mu\text{m}$  (Rouessac et Rouessac, 2004; Skoog *et al.*, 2003). Ces colonnes ont de très bonnes performances analytiques. Les phases stationnaires les plus populaires sont composées de silice greffée par des chaînes linéaires de 8 ou 18 carbones ( $\text{C}_8$  et  $\text{C}_{18}$ ) (Rouessac et Rouessac, 2004). Ces phases sont hydrophobes et nécessitent donc un éluant (phase mobile) polaire afin de désorber les espèces hydrophobes de la phase stationnaire. Ainsi, les composés les plus polaires seront élués en premier pendant que les composés plus hydrophobes prennent plus de temps à sortir de la colonne. En variant la composition de la phase mobile en fonction du temps, on réalise une chromatographie dite en mode gradient (Rouessac et Rouessac, 2004; Skoog *et al.*, 2003). C'est finalement le mode d'élution utilisé dans le présent projet de recherche, pour séparer et quantifier l'iohexol, l'iodixanol et le standard interne, qui a été employé.



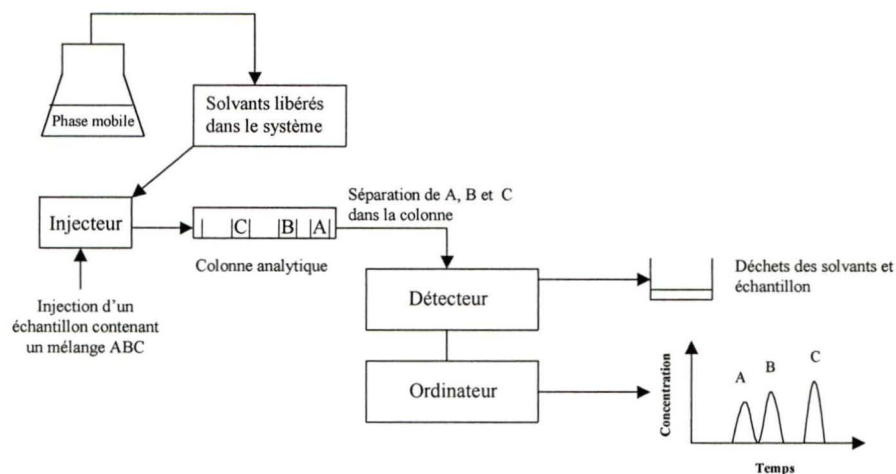


Figure 7: Schéma représentant le principe de la chromatographie liquide à haute performance (adapté de l'ouvrage de Rouessac et Rouessac, 2004).

Un détecteur situé à la sortie de la colonne enregistre le passage des analytes les uns après les autres et génère ce qu'on appelle un chromatogramme (Rouessac et Rouessac, 2004). Afin de permettre la quantification, le signal généré doit être proportionnel à la concentration du composé analysé. Dans la présente étude, le détecteur utilisé est un spectromètre de masse (Mass spectrometer (MS)).

Tout MS comprend un système d'introduction de l'échantillon (la sortie de la colonne HPLC dans notre cas), une source d'ionisation et un analyseur de masse (Rouessac et Rouessac, 2004). Grâce à la simplicité de couplage direct de l'HPLC au MS, différentes techniques de séparation (HPLC, CE) peuvent être exploitées. Le MS utilisé est muni d'une source nommée nébulisateur électrostatique ou

électrospray (electrospray (ESI)) dont le schéma est présenté à la figure 8.

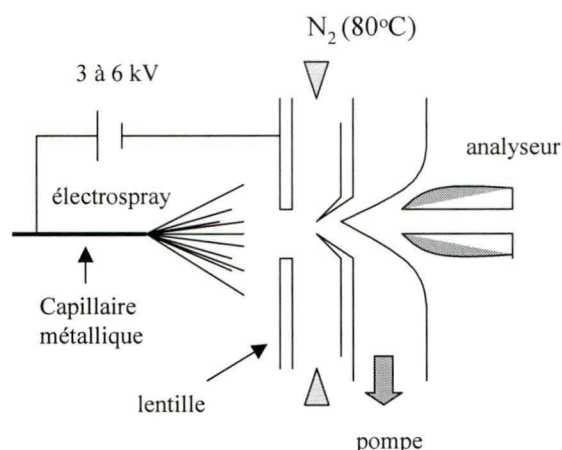


Figure 8 : Schéma d'une source à nébulisation électrostatique (adapté de l'ouvrage de Hoffmann et Stroobant, 2005).

La nébulisation électrostatique est obtenue à l'extrémité du capillaire couvert d'une couche métallique (tube d'acier inox) suite à l'application, à pression atmosphérique, de 3 à 6 kV (du capillaire à la contre-électrode) sur l'éluat le traversant. L'éluat est converti en une gouttelette à l'extrémité du capillaire qui sera transformée à son tour en un fin pinceau de gouttelettes chargées appelé cône de Taylor (Hoffmann et Stroobant, 2005). Elles seront évaporées de leur solvant à l'aide d'un jet d'azote dirigé dans la source. Les gouttelettes chargées maintenant de faible taille deviendront des micro-gouttelettes avec une densité de charge plus élevée jusqu'à ce que les forces coulombiennes répulsives puissent atteindre le niveau des forces de cohésion des

micro-gouttelettes (nommé aussi limite de Rayleigh) et provoquer l'émission directe d'ions primaires, tel que démontré dans la figure 9 (Tang *et al.*, 1993). Ces ions seront transférés dans un analyseur.

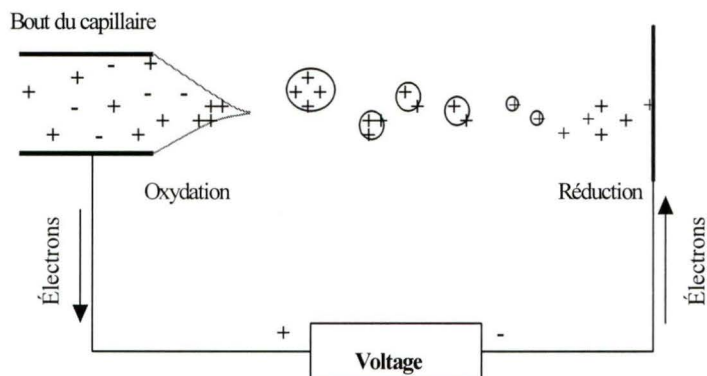


Figure 9: Schéma représentant le processus électrochimique de la formation des ions positifs par nébulisation électrostatique (adapté de l'ouvrage de Hoffmann et Stroobant, 2005).

Dans ce présent travail, on a utilisé un analyseur à temps de vol (time of flight (TOF)) à réflectron dont le schéma est représenté à la figure 10.

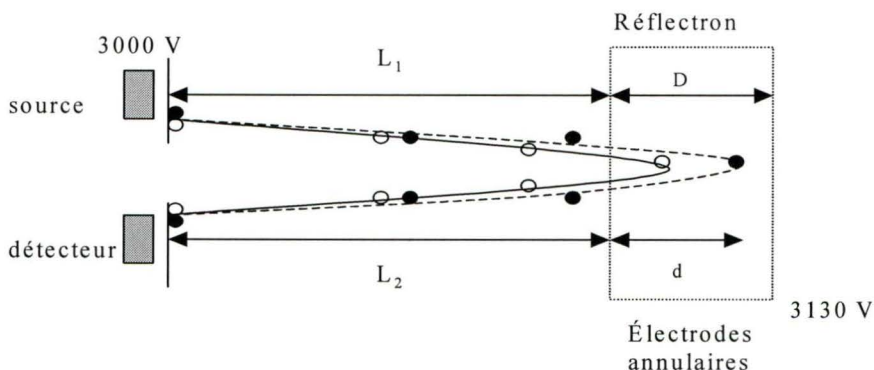


Figure 10 : Représentation d'un spectromètre de masse à temps de vol à réflectron (adapté de l'ouvrage de Hoffmann et Stroobant, 2005).

Le Tof sépare les ions en fonction de leur vitesse de déplacement dans le tube de vol (tube sans champ). Le réflectron est placé à la fin du tube de vol et est constitué d'une série de grilles et d'électrodes annulaires portées à des potentiels croissants, qui définissent un champ électrique homogène (Hoffman et Stroobant, 2005). Il permettra aux ions qui entrent dans le réflectron de ralentir jusqu'à s'arrêter pour ensuite faire demi-tour et être renvoyés vers le tube de vol. Les ions possédant une énergie cinétique plus élevée que les ions de même rapport masse sur charge ( $m/z$ ) pénétreront plus profondément au sein du réflectron. Ils passeront donc simplement plus de temps dans le réflectron avant d'être renvoyés dans le tube de vol. Le réflectron permet ainsi de focaliser tous les ions de même  $m/z$  sur un plan, quelles que soient leurs énergies cinétiques initiales. De ce fait, l'exactitude obtenue sur les mesures de masse est de l'ordre de quelques mDa (Cornish et Cotter, 1997).

Dans la présente étude, le MSD-Tof a été opéré en mode positif et les ions générés pour l'iohexol, l'iodixanol et le standard interne sont leurs espèces protonées,  $M+H^+$ . L'analyse quantitative a été faite à l'aide du logiciel « Analyst QS ». Une image du système HPLC-MSD Tof de Agilent Technologies (comme celui utilisé dans le présent projet) est représenté à la figure 11.

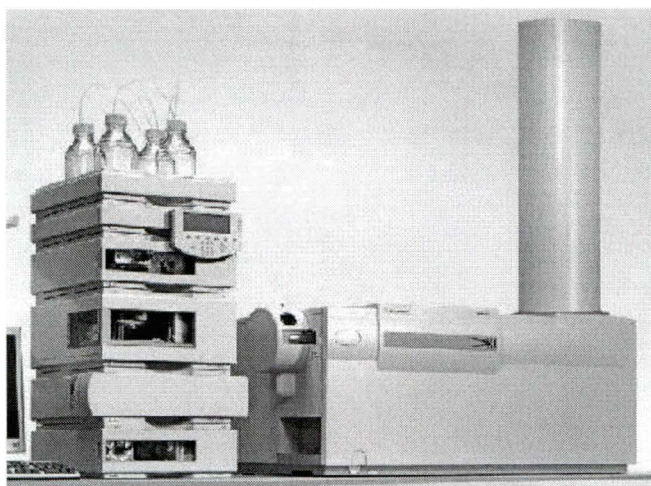


Figure 11 : HPLC-MSD Tof de Agilent Technologies reproduit avec la permission de l'Université de Montréal.

## 6. PHARMACOCINÉTIQUE DE L'IOHEXOL ET DE L'IODIXANOL

Une section sur des notions de base en pharmacocinétique et de dérivation d'équations adjacentes s'impose pour la compréhension de la suite du mémoire. Les calculs de clairance de l'iohexol et de l'iodixanol dérivent des équations présentées dans cette présente section.

### 6.1 Définition

La pharmacocinétique est l'étude, en fonction du temps, des différents aspects (absorption, distribution et élimination) du devenir in vivo de la molécule dans l'organisme (Barr, 1968; Walsh et Schwartz-Bloom, 2005).

La voie d'administration de l'iohexol et l'iodixanol est de type intra-vasculaire (IV) ou intra-artérielle (IA). Ces voies d'administration éliminent le processus d'absorption (site d'administration jusqu'au sang) des molécules.

L'injection IV et IA sont des modes de distribution rapides. La distribution d'une molécule dans le sang dépend de la vascularisation des organes cibles et des tissus (plus l'organe est vascularisé, tels que le cerveau, le rein, le foie et le coeur, plus la distribution se fait rapidement), des sites de pertes (liaisons) à d'autres cellules ou tissus (par exemple, la molécule peut être captée par les cellules adipeuses et causer une perte de son principe actif), et des liaisons aux protéines plasmatiques (site d'action de la molécule peut ne pas être disponible à cause de sa liaison protéique). Dans le cas où la molécule est sous la forme libre, non-liée aux protéines plasmatiques, elle se diffusera dans l'espace extra-vasculaire et les tissus (Aiach *et al.*, 1985, Walsh et Schwartz-Bloom, 2005). Le volume apparent (volume du liquide du corps dans lequel le médicament va être dissout) et le pourcentage de liaison aux protéines plasmatiques sont des caractéristiques du principe actif de la molécule et précisent l'ampleur de sa distribution dans l'espace vasculaire et extravasculaire. Des études *in vitro* ont démontré que l'iohexol et l'iodixanol ne se liaient pas aux protéines plasmatiques (Hizoh et Haller, 2002; Jacobsen *et al.*, 1999; Schick et Haller, 1999), ce qui permet d'affirmer que leur distribution se fait à 100 %.

Quant au processus d'élimination d'une molécule dans l'organisme, il est caractérisé par son élimination soit sous forme inchangée ou sous forme d'un ou de plusieurs métabolites. Le rein est le principal organe où se passe l'élimination alors que le foie est le principal organe où la biotransformation de la molécule se passe. La voie biliaire permet, quant à elle, la réabsorption dans l'intestin de la molécule ou de ces métabolites excrétés (Walsh et Schwartz-Bloom, 2005).

Comme il a déjà été mentionné dans la section 3.5 et 3.6, l'iohexol et l'iodixanol sont des molécules qui ne sont pas métabolisées (Aakhus *et al.*, 1980; Aakhus *et al.*, 1983; Frennby, 1996), qui n'ont pas d'organe cible et qui ont une biodisponibilité absolue de 100 %. Leur diffusion répond uniquement à un simple gradient de concentration molaire de part et d'autre des capillaires (Frennby, 1996). Ainsi, leur élimination est essentiellement rénale, une simple filtration glomérulaire est exercée sans sécrétion tubulaire ni réabsorption tubulaire (Frennby, 1996; Krutzen, 1984).

## 6.2 Ordre de transfert et modèles compartimentaux

L'ordre de transfert est caractérisé par l'influence de la concentration plasmatique sur la vitesse de réaction. L'absorption, la distribution et l'élimination de la molécule dans l'organisme sont soumises à des processus de transfert à des vitesses variables. Il existe deux sortes d'ordre de transfert,

soient la réaction d'ordre zéro et la réaction d'ordre un (Aiach *et al.*, 1985; Walsh et Schwartz-Bloom, 2005).

La réaction d'ordre 0 est caractérisée par une variation constante de la concentration plasmatique en fonction du temps (figure 12), dont l'expression

mathématique est :  $\frac{dC_p}{dt} = -k = \text{vitesse constante.}$

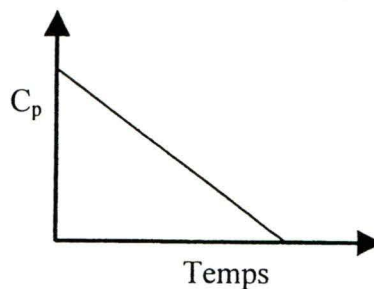


Figure 12 : Représentation graphique de la réaction d'ordre 0.

L'intégration de cette équation est :  $C_p = C_0 - kt.$

Alors que la réaction d'ordre un est caractérisée par la vitesse de réaction qui est directement proportionnelle à la concentration plasmatique dans un temps  $t$  (figure 13 A), dont l'expression mathématique est :

$$\frac{dC_p}{dt} = kC_p$$



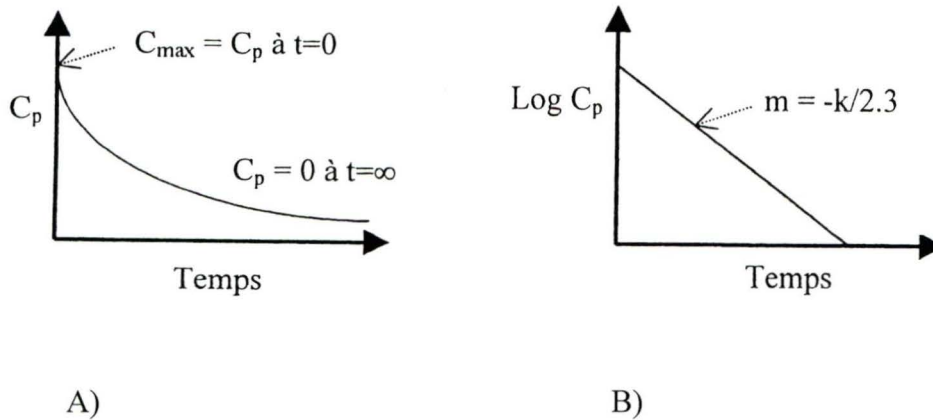


Figure 13 : Représentation graphique de la réaction d'ordre un (A) et de sa transformation logarithmique (B).

L'intégration de cette équation :  $C_p = C_0 e^{-kt}$ .

La transformation logarithmique ( $\log_{10}$ ) permet de calculer la constante (k) (figure 13 B), qui peut soit être une constante d'absorption, de distribution ou d'élimination :

$$\log C_p = \log C_0 - \left( \frac{kt}{2,303} \right).$$

La pente de la droite est égale à  $-k/2,303$  et se calcule ainsi :

$$pente = \frac{\log C_1 - \log C_2}{t_1 - t_2} = - \left( \frac{k}{2,303} \right).$$

Pour ce qui est de l'iohexol et de l'iodixanol, les vitesses de réaction sont proportionnelles à la concentration plasmatique, c'est-à-dire qu'il s'agit d'une réaction d'ordre un.

Lorsque le processus de transfert est un ordre de réaction un, le modèle pharmacocinétique compartimental est linéaire (Walsh et Schwartz-Bloom, 2005). C'est-à-dire que la relation entre la dose administrée par voie intra-artérielle (ou intraveineuse) et la concentration plasmatique à un temps donné est linéaire (plus exactement la surface sous la courbe de la concentration plasmatique en fonction du temps).

Afin de faciliter l'écriture des équations différentielles expliquant le transfert de la molécule entre les compartiments, son entrée et son élimination d'un compartiment, les modèles pharmacocinétiques compartimentaux ont été créés. Les compartiments représentent des ensembles d'organes et de tissus ayant à peu près les mêmes débits sanguins et les mêmes affinités pour la molécule. Le compartiment central ( $V_1$ ) (figure 14) représente le compartiment plasmatique (veine ou artère) alors que les compartiments tissulaires sont des compartiments périphériques et ils peuvent être nombreux ( $V_2$  à  $V_n$ ) (Aiach *et al.*, 1985).

Prenons l'exemple de l'injection intra-artérielle de nos analytes d'intérêt :

Le modèle pharmacocinétique à 1 compartiment est représenté à la figure 14.

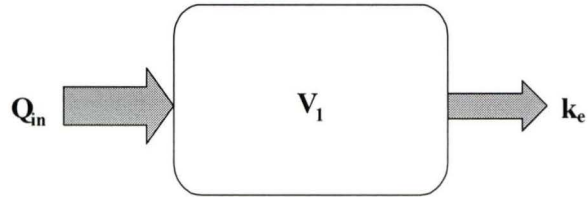


Figure 14 : Représentation schématique du modèle à 1 compartiment.

Le  $Q_{in}$  représente le débit de la molécule à l'entrée du compartiment 1 alors que le  $k_e$  représente la constante d'élimination de la molécule une fois sortie du compartiment 1. L'absorption est instantanée dans le compartiment central et son élimination est directe (Aiach *et al.*, 1985; Page *et al.*, 1999).

Le modèle pharmacocinétique à 2 compartiments est illustré à la figure 15.

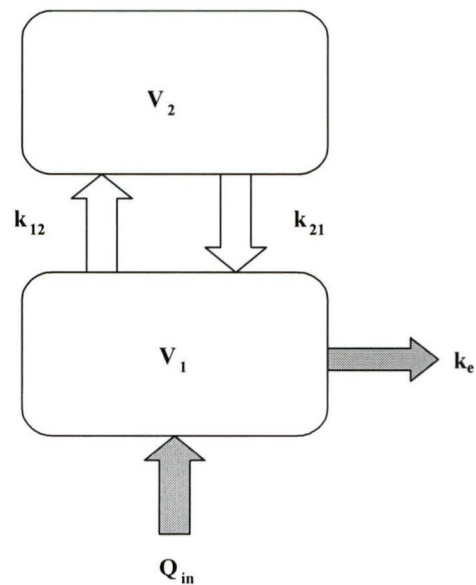


Figure 15 : Représentation schématique du modèle à 2 compartiments.

Ce modèle montre qu'il y a distribution de la molécule dans un compartiment périphérique ( $V_2$ ). De ce fait, des constantes d'échanges ( $k_{12}$  et  $k_{21}$ ) entre le compartiment central ( $V_1$ ) et le compartiment périphérique sont alors visibles. L'élimination est possible à partir du compartiment central, du compartiment périphérique ou des 2 compartiments (Aiach *et al.*, 1985; Page *et al.*, 1999).

L'iohexol et l'iodixanol ont des modèles pharmacocinétiques à 2 compartiments (Svaland *et al.*, 2002). Seuls les paramètres de mesure du modèle à 2 compartiments seront présentés et traités dans ce présent mémoire.

### 6.3 Paramètres de mesure

Les équations essentielles aux calculs de la clairance de l'iohexol et de l'iodixanol sont présentées dans cette section.

#### 6.3.1 *Volume de distribution apparent*

Afin de connaître le volume de distribution apparent ( $V_{app}$ ) de l'iohexol et de l'iodixanol, l'équation suivante est appliquée :

$$V_{app} (L) = \frac{\text{dose administrée}}{\text{concentration plasmatique initiale}}$$

Ainsi, plus la molécule va aux tissus, plus la concentration plasmatique mesurée est petite et plus  $V_{app}$  est grand. Un  $V_{app}$  grand signifie alors une grande distribution tissulaire. Le  $V_{app}$  peut également être exprimé en L/Kg, soit en divisant le  $V_{app}$  par le poids du sujet (Walsh et Schwartz-Bloom, 2005).

### 6.3.2 Constantes de vitesse

Les calculs des constantes de distribution et d'élimination de l'iohexol et de l'iodixanol sont effectués à l'aide de ces équations :

$$(1) \quad V_1 \frac{dC_1}{dt} = \frac{dQ_1}{dt} = k_{21}Q_2 - k_{12}Q_1 - k_e Q_1,$$

$$(2) \quad C_p = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t},$$

L'équation (2) est le résultat d'une transformation mathématique suite à un calcul différentiel de l'équation (1) (Aiach *et al.*, 1985) où  $C_p$  représente la concentration plasmatique,  $\alpha$  et  $\beta$  sont des constantes de vitesse respectives des phases de distribution et d'élimination et A et B sont des concentrations au temps initial pour chacune des phases (figure 16).

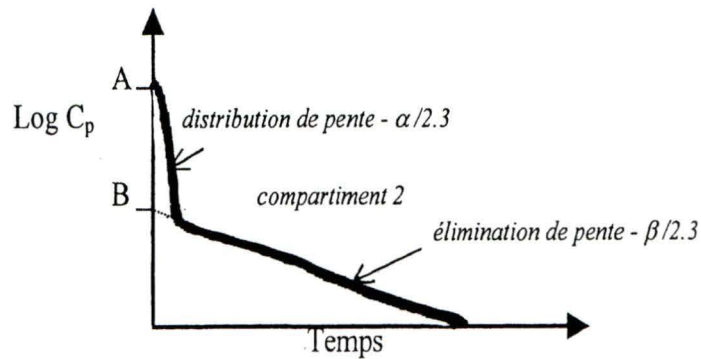


Figure 16: Représentation graphique des phases de distribution et d'élimination pour un modèle pharmacocinétique à deux compartiments.

Quand  $\alpha \gg \beta$ ,  $Ae^{-\alpha t}$  devient rapidement négligeable par rapport à  $Be^{-\beta t}$ , c'est-à-dire que le temps de distribution est négligeable par rapport au temps d'élimination. L'équation de la concentration plasmatique peut être modifiée de la façon suivante :

$$C_p = Be^{-\beta t} \Rightarrow C_p = C_0 e^{-k_e t},$$

où  $C_0$  représente la concentration de la molécule au temps zéro. Seule la constante d'élimination ( $k_e$ ) est calculée dans cette équation (Aiach *et al.*, 1985).

### 6.3.3 Temps de demi-vie

La définition du temps de demi-vie ( $t_{1/2}$ ) est la suivante : le temps nécessaire pour le demi achèvement du processus d'absorption ou d'élimination de la molécule (Page *et al.*, 1999).

Dans ce cas-ci, c'est le  $t_{1/2}$  du processus d'élimination :

$$C_p = C_0 e^{-k_e t} \text{ à } t_{1/2}, C_p = \frac{C_0}{2} \Rightarrow t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_e} = \frac{0,693}{k_e}.$$

#### 6.3.4 Clairance plasmatique et clairance rénale

Lorsqu'une substance est complètement éliminée par la FG, la clairance plasmatique calculée avec la courbe de décroissance dans le temps de la substance est donc équivalente à la clairance rénale (Aiach *et al.*, 1985; Page *et al.*, 1999; Walsh et Schwartz-Bloom, 2005). Ainsi pour l'iohexol et l'iodixanol, les clairances se calculent comme suit :

$$Cl = \frac{\text{vitesse d'excrétion}}{\text{concentration plasmatique}} = \text{ml/min}.$$

Lorsqu'on est en présence d'un processus d'ordre un et que les molécules s'éliminent par simple FG, la clairance rénale est alors indépendante de la concentration plasmatique des molécules. D'où, il est possible de simplifier mathématiquement l'équation de la clairance rénale par cette équation :

$$Cl = k_{e\beta} \times V_{app}.$$

## **TROISIÈME CHAPITRE**

### **MÉTHODOLOGIE**

Tel que mentionné en introduction, la présentation de ce chapitre ainsi que celle des chapitres suivants est à l'image des spécificités de cette étude car elle comporte une partie fondamentale et une partie clinique. Ainsi, la méthodologie utilisée pour la mise au point de la méthode analytique pour l'iohexol et l'iodixanol est présentée dans un premier temps. Viennent ensuite les éléments méthodologiques relatifs à l'étude clinique.

#### **1. MISE AU POINT DE LA MÉTHODE ANALYTIQUE POUR MESURER L'IOHEXOL ET L'IODIXANOL**

##### **1.1 Mesure de l'iohexol et de l'iodixanol**

Un protocole de recherche scientifique avait été élaboré afin de séparer et de quantifier l'iohexol et l'iodixanol dans le plasma pour un électrophorèse capillaire avant celui par HPLC-MSD ToF. Malheureusement, il n'a pas été possible d'obtenir une méthode de séparation adéquate et suffisamment robuste pour être appliquée à des fins de quantification. Cependant, le travail



analytique effectué à l'aide du CE reste intéressant et sera décrit puisqu'il a nécessité beaucoup de travail.

Pour les deux instruments (CE et HPLC-MSD), la description du matériel, les étapes du protocole de laboratoire ainsi que les conditions analytiques sont présentées. Cependant, étant donné que le mémoire est également présenté sous forme d'article, les aspects méthodologiques relatifs à l'utilisation du HPLC-MSD Tof se retrouvent dans le manuscrit de l'article au chapitre 4.

#### *1.1.1 Electrophorèse capillaire*

##### *Matériel*

L'iohexol (forme solide : Histodenz<sup>TM</sup>,  $C_{19}H_{26}I_3N_3O_9$ , PM : 821.1 g/mol), l'iodixanol (Opti prep, dilué dans l'eau, pureté à 60%), le standard interne, 3-isobutyl-1-méthylxanthine ( $C_{10}H_{14}N_4O_2$ , PM : 225,25 g/mol, pureté à 99,0 %), l'acide borique ( $H_3BO_3$ , PM : 61.8g/mol, pureté à 99.0 %), le sodium monophosphate ( $NaH_2PO_4$ , PM : 119.98 g/mol, pureté à 99.0 %) et le sodium diphosphate ( $Na_2HPO_4$ , PM : 141,96 g/mol, pureté à 99.0 %) ont été achetés de la compagnie Sigma-Aldrich (Oakville, Ontario). L'albumine bovine (pureté à 98.0 %) et l'acétonitrile ( $CH_3CN$ ) proviennent également de la compagnie

Sigma-Aldrich (St.Louis, USA). Iohexol (Omnipaque<sup>TM</sup>, 300 mgI/mL) et Iodixanol (Visipaque<sup>TM</sup>, 320 mgI/mL) ont été fournis par la compagnie Amersham Health Inc. (Oakville, Ontario). La solution hydroxyde de sodium de 0.1M provient de la compagnie Fluka (Germany) alors que la solution chlorure de sodium à 0,154M (9 mg/mL) vient de chez Abbott (Canada).

#### *Pool de plasma*

Un pool de plasma humain provenant du laboratoire de biochimie de l'hôpital Charles LeMoine (HCLM) a été constitué afin de mimer de façon la plus vraisemblable les échantillons de sujets pour le développement de la méthode analytique.

#### *Préparation des solutions tampons*

Deux solutions tampons ont été utilisées pour ce protocole de laboratoire: le tampon borate et le tampon phosphate (annexe B). Le tampon borate à un pH 8.8 et une concentration de 220 mM a été utilisé lors de la séparation par électrophorèse capillaire pendant que le tampon phosphate à 6 mM et un pH de 7.4 a été utilisé dans la préparation des solutions mères de iohexol, iodixanol et de iohexol-iodixanol.

### *Préparation des solutions mères*

Les solutions mères ont permis de faire les courbes standard pour calibrer l'EC. Elles ont toutes été créées à partir des substances chimiques d'iohexol et d'iodixanol sous forme de cristaux. Trois solutions mères (iohexol, iodixanol et iohexol-iodixanol) de 8 g/L ont alors été produites, puis diluées dans 6 mM de tampon phosphate à pH 7,4 contenant 60 g/L d'albumine bovine et 0,154 M de NaCl (annexes C à E).

### *Courbes standards*

Les courbes standards d'iohexol, d'iodixanol et d'iohexol-iodixanol (voir annexes C à E) ont été constituées à partir des solutions mères et du pool de plasma recueilli à HCLM, dont les valeurs de concentrations vont de 20 à 160 mg/L. Les valeurs de ces concentrations ont été choisies selon la limite de détection de l'iohexol (environ 10 mg/L) et de sa concentration maximale sans saturation, qui variait autour de 200 mg/L.

Trois courbes standards ont été faites plutôt qu'une seule étant donné que le profil de séparation du mélange iohexol-iodixanol était inconnu dans la littérature.

### *Préparation des échantillons de contrôle*

Les échantillons de contrôle ont été produits à l'aide des mêmes substances de contraste utilisées auprès des sujets lors d'examen d'imagerie médicale. Des solutions de concentration de 160 mg/L d'iohexol (Omnipaque™), d'iodixanol (Visipaque™) et d'iohexol-iodixanol (Omnipaque™-Visipaque™) ont été préparées avec le pool de plasma recueilli de HCLM (voir annexes F à H). Pour chacune des courbes standards, trois échantillons de concentrations différentes (20, 40 et 80 mg/L) ont été préparés à partir des solutions de 160 mg/L.

### *Extraction des protéines*

Une solution de 25 mL d'acétonitrile contenant 0,02 mg/mL du standard interne a été préparée pour l'extraction des protéines. Pour chaque 100 µL d'échantillons standards, de contrôles et même de sujet, 200 µL de la solution acétonitrile-standard interne ont été ajoutés. Ces solutions ont été par la suite mélangées au vortex pendant 20 secondes, puis centrifugées à 13 000 rpm pendant 3 minutes afin d'avoir toutes les conditions optimales pour la déprotéinisation des échantillons. Tous les échantillons ont été conservés à 4°C jusqu'à l'étape de filtration, qui précédait leur analyse en EC.

### *Électrophorèse capillaire*

Les électrophérogrammes ont été obtenus avec le système P/ACE™ MDQ (Beckman Coulter, CA) contrôlé par le logiciel PACE Station, version 1,21, et contenant un détecteur UV à longueurs d'onde variable. Toutes les séparations ont été réalisées à 30°C, dans un capillaire de silice de 57 cm de longueur totale (50 cm à la fenêtre) et 50 µm de diamètre interne, par application d'un voltage de 24 kV. Le tampon de séparation était le tampon borate de 220 mM dont le pH était ajusté à 8,8 avec du NaOH 2,5 M. Au début de chaque journée d'utilisation de l'instrument, les échantillons, les solutions tampons et les solutions de rinçage étaient filtrés à l'aide des filtres à seringues en acétate de 0,20 µm avant d'être placés dans le carrousel de l'instrument. Ensuite, le capillaire était rincé avec du NaOH 1,0 M pendant 15 min, suivi par H<sub>2</sub>O bidistillée pendant 10 min, puis conditionné avec le tampon de séparation pendant 15 minutes. Après chaque injection d'échantillon, le capillaire était rincé pendant 2 minutes avec du NaOH 0,1 M et reconditionné pendant 5 minutes dans le même tampon de séparation. Les injections des échantillons (environ 7 nL) étaient réalisées par l'application d'une pression à l'entrée du capillaire de 55 kPa/sec pendant 8 secondes.

### 1.1.2 HPLC-MSD Tof

La méthode analytique est présentée dans le manuscrit de l'article à la section 2.4.1. du quatrième chapitre.

## 2. ÉTUDE CLINIQUE : IOHEXOL ET IODIXANOL COMME MARQUEURS DE FILTRATION GLOMÉRULAIRE CHEZ DES SUJETS EXPOSÉS SIMULTANÉMENT AUX DEUX SUBSTANCES DE CONTRASTE

Nous avons conçu une étude clinique à petite échelle dans un contexte plus spécifique, celui des sujets devant subir une angiographie abdominale ou des membres inférieurs avec ou sans angioplastie. Ce secteur est intéressant puisqu'on y privilégie l'usage de l'iodixanol, substance de contraste réputée moins néphrotoxique que l'iohexol, et les procédures autour de l'intervention (séjour en ambulatoire, horaire de la journée, hydratation) sont uniformisées.

Afin de répondre aux objectifs de cette étude clinique, il fallait obtenir des échantillons sanguins après l'administration de substance de contraste pour étudier la pharmacocinétique des molécules d'intérêt (iohexol et iodixanol) et calculer leur clairance, donc une application clinique de la nouvelle méthodologie analytique. Il fallait aussi montrer qu'une dose traceur de 5 mL d'iohexol était suffisante pour évaluer sa clairance grâce à la méthodologie analytique permettant de séparer l'iohexol et l'iodixanol administrés simultanément, comparer la performance des différents marqueurs de FG à l'étalon d'or de la clairance d'iohexol et enfin réaliser le tout sans modifier significativement les procédures usuelles de l'angiographie.

## 2.1 Dispositif de l'étude

Afin de répondre aux objectifs de recherche, le dispositif de recherche choisi est une étude quasi-expérimentale à séries temporelles post-angiographie pour deux groupes de sujets. Le schéma du dispositif choisi est représenté à la figure 17 :

$$\begin{aligned} Y^+ : & \quad O_0 \ X \ O_1 O_2 O_3 O_4 O_5 O_6 \\ Y^- : & \quad O_0 \ X \ O_1 O_2 O_3 O_4 O_5 O_6 \end{aligned}$$

Figure 17 : Schéma représentant le dispositif de recherche quasi-expérimental à séries temporelles post-intervention pour deux groupes de sujets (où  $O_0$  représente un prélèvement sanguin effectué pré-intervention,  $X$  illustre l'intervention et  $O_1$  à  $O_6$  indiquent que six prélèvements sanguins sont faits post-intervention à différents temps).

Le choix de ce dispositif à séries temporelles post-angiographie a été déterminé afin de permettre de décrire et d'évaluer la cinétique de la clairance de l'iohexol et de l'iodixanol chez les sujets des deux groupes.

## 2.2 Population à l'étude

Deux groupes de sujets de l'Hôpital Charles LeMoine ont été recrutés pour ce projet. Le premier groupe ( $Y^+$ ) est représenté par des sujets en bonne santé n'ayant aucun problème rénal diagnostiqué ( $ClCrC$  par l'équation de Cockcroft et Gault  $\geq 60$  mL/min) et devant passer une angiographie

abdominale ou des membres inférieurs avec ou sans angioplastie à la demande de leur médecin traitant. Le deuxième groupe (Y-) a été constitué de sujets connus pour avoir un certain degré de dysfonction rénale (ClCrC par l'équation de Cockcroft et Gault  $< 60$  mL/min) et devant subir une angiographie abdominale ou des membres inférieurs avec ou sans angioplastie à la demande de leur médecin traitant.

Les sujets correspondant aux critères d'inclusion suivants ont été recrutés:

- Âge: 18 ans et plus;
- Calcul récent de la clairance de créatinine par l'équation de Cockcroft et Gault;
- Leur médecin demande qu'ils passent une angiographie abdominale ou des membres inférieurs avec exposition aux substances de contraste iodées.

### 2.3 Échantillon

L'échantillon a été constitué de sujets référés par des médecins des services de médecine interne, de néphrologie et de chirurgie vasculaire. La stratégie d'échantillonnage est non-probabiliste (Fortin *et al.*, 2006). L'échantillonnage par choix raisonné a été préféré afin de sélectionner les sujets qui répondaient aux critères d'inclusion nommés ci-haut.

À cause de la nature exploratoire de l'étude, la taille de l'échantillon a été établie à 20 sujets au total pour les deux groupes. Ainsi, chacun des



groupes a été composé de 10 sujets. Ces tailles d'échantillon devaient permettre de mesurer une corrélation de plus de 0,785 (80% de puissance, avec un seuil de signification statistique de  $\alpha$  à 5 % bilatérale ou une valeur de  $p \leq 0,05$ ) à l'intérieur de chaque groupe et une corrélation de plus de 0,591 (80% de puissance, avec un seuil de signification statistique de  $\alpha$  à 5 % bilatérale ou une valeur de  $p \leq 0,05$ ) pour l'ensemble des sujets.

#### 2.4 Recrutement des sujets

Le premier contact avec un sujet potentiel a été fait par son médecin traitant. Ce dernier expliquait les grandes lignes du projet et lorsque le sujet acceptait, le médecin transmettait le nom et les coordonnées du sujet à l'équipe de recherche. Une fois les coordonnées du sujet obtenues, un des membres de l'équipe de recherche a communiqué avec le sujet (en personne ou par téléphone) pour lui expliquer en détail le projet et lui expliquer en quoi consistait sa participation. La journée même de l'examen angiographique, le sujet a été rencontré avant le début de la procédure pour lui réexpliquer l'étude (objectifs, étapes, participation, etc). À la suite de ces explications, si le sujet acceptait toujours de participer, et après obtention du consentement (annexe I), le sujet était enrôlé.

## 2.5 Variables à l'étude

Dans cette étude, les variables dépendantes sont la clairance de l'iohexol et de l'iodixanol, la clairance de la cystatine C et la clairance de la créatinine plasmatique. La variable indépendante est l'exposition à 5 mL d'iohexol et environ 95 mL d'iodixanol. Les variables anthropométriques suivantes ont été également évaluées : âge, sexe, poids et taille du sujet.

## 2.6 Sources des données

Les données des variables anthropométriques, énumérées à la section précédente, ont été recueillies dans le dossier hospitalier du sujet de l'Hôpital Charles LeMoyne faisant partie du projet de recherche. Les données des mesures de créatinine plasmatiques ont pu être extraites des feuilles de laboratoire de biochimie envoyées à l'unité de soin du sujet tel que discuté auparavant et retranscrite sur une grille d'observation élaborée pour chaque sujet. Le volume de contraste iohexol et iodixanol était également noté le jour de l'intervention sur la même grille d'observation. Le volume de contraste iohexol (Omnipaque<sup>TM</sup>) était pré-déterminée à 5 mL; puis, confirmé avant l'intervention. Pour ce qui est du volume d'iodixanol (Visipaque<sup>TM</sup>), il était noté sur une feuille d'examen vasculaire au fur et à mesure que l'angioradiologiste l'injectait en séquence au sujet. Le total du volume d'iodixanol a été calculé et validé par une technicienne de vasculaire en

radiologie présente lors de l'intervention. L'iohexol a été injecté dans un premier temps puis suivi de l'iodixanol.

Les données des prélèvements sanguins supplémentaires concernant la mesure de la cystatine C proviennent d'analyses biochimiques des immunocomplexes mesurés en turbidimétrie à l'aide d'un multianalyseur Olympus AU 640 (annexe A, protocole pré-établi dans le cadre de ce projet). Alors que celles nécessaires pour les mesures de clairance d'iohexol et d'iodixanol proviennent d'analyses des taux plasmatiques de ces molécules par HPLC-MSD de l'Université de Montréal.

Les essais concernant la mise au point de la méthode de séparation des molécules iohexol-iodixanol dans des échantillons de concentrations standards ont été faits par électrophorèse capillaire de l'Université du Québec à Montréal.

## 2.7 Déroulement de l'étude

Afin de répondre à l'objectif 1) de l'étude, nous avons mis au point la méthode de séparation des molécules iohexol et iodixanol pour un HPLC-MSD Tof. Cette étape a été laborieuse et elle a été optimisée pendant environ un an (année 2005). Il est important de mentionner que le développement de la méthode analytique par CE a été également réalisée durant l'année 2005. La

validation de la méthode HPLC-MSD Tof a été faite au début de l'année 2006. Une fois la méthode analytique validée, le recrutement des sujets a été débuté. Étant donné qu'il n'a pas été possible de recruter l'ensemble des sujets à fonction rénale altérée durant la période de 4 mois prévue à cet effet, soit de septembre à décembre 2006, les résultats présentés dans ce mémoire ne concernent que 17 sujets soit 10 sujets avec une fonction rénale normale et 7 sujets avec une fonction rénale altérée.

Les mesures de la clairance de l'iohexol et l'iodixanol ont été faites à partir de 7 prélèvements sanguins, chacun de 10 mL, c'est-à-dire 1 pré et 6 post-angiographie, soient après 1, 2, 3, 4, 8 et 24 heures. Pour ce qui est des mesures de la cystatine C, un seul prélèvement sanguin de 10 mL a été nécessaire 4 heures après l'angiographie et a été fait en même temps que celui prévu pour la clairance de l'iohexol et de l'iodixanol. Pour les sujets n'ayant aucun résultat de créatinine plasmatique apparaissant au dossier lors des 3 derniers mois, un prélèvement sanguin de 3 mL pré-angiographie a été fait, en même temps que celui de l'iohexol-iodixanol. Un prélèvement sanguin de 3 mL post-4 heures de l'angiographie a été fait pour tous les sujets en même temps que celui de la cystatine C et celui de l'iohexol-iodixanol.

Lors des soins usuels les sujets qui subissent une angiographie ont un prélèvement sanguin pour la mesure de la créatinine plasmatique qui doit normalement être fait en milieu hospitalier, et parfois en série pendant

quelques jours pour suivre l'évolution. Dans le cadre du projet de recherche, nous avons ajouté 6 prélèvements de chacun de 10 mL pour la mesure de la clairance de l'iohexol, après 1, 2, 3, 4, 8 et 24 heures de l'angiographie; en plus, d'un prélèvement juste avant l'angiographie.

Un volume de 13 mL de sang a été aussi prélevé 4h après l'angiographie pour mesurer la cystatine C et la créatinine afin de mieux connaître la fonction rénale du sujet. Comme mentionné auparavant, la créatinine est un test de routine utilisé en milieu hospitalier alors que la cystatine C est un test plus récent qui est toujours en évaluation.

Pour les deux groupes de sujets à l'étude, on a prélevé au total 83 mL de sang de plus que ce qui aurait été prélevé habituellement sans le projet. Ainsi, chaque sujet a eu un prélèvement sanguin avant l'examen et 6 autres après l'angiographie. Tous les prélèvements ont été faits à l'intérieur de 24 heures et à cette fin, un petit cathéter à prélèvement était laissé en place, lorsque c'était possible, pour minimiser le nombre de ponctions veineuses.

L'analyse de la clairance d'iohexol et d'iodixanol des échantillons de chacun des sujets par HPLC-MSD Tof a été effectué en duplicata (environ 1 journée/sujet). Il en va de même pour l'analyse en duplicata de la cystatine C post-4 heures pour chacun des sujets à l'aide du protocole pré-établi à HCLM (environ 2 jours au total).

## 2.8 Analyse des données

Les données recueillies à partir du dossier du sujet et des feuilles de laboratoires ont été notées sur une grille d'observation saisies ensuite dans Excel 97 et SPSS, version 15,0. Alors que les données provenant des instruments de mesure ont été saisies et traitées uniquement avec le logiciel Excel 97. Les analyses non-paramétriques ont été effectuées à l'aide du logiciel SPSS, version 15,0.

### 2.8.1 *Analyse descriptive*

#### *Données anthropométriques*

Les variables sexe, âge, poids et taille ont été notées à partir du dossier du sujet le jour même de l'intervention sur une grille d'observation. Une analyse non-paramétrique par un test de Mann-Whitney-Wilcoxon a été réalisée sur les variables anthropométriques énumérées ci-haut afin d'évaluer l'homogénéité de ces variables dans chacun des groupes de sujet et dans l'ensemble des sujets. Le seuil de signification  $\alpha = 0,05$  en bilatéral a été retenu.

#### *Pharmacocinétique*

Suite au développement du protocole scientifique permettant la séparation et quantification de l'iohexol et de l'iodixanol par HPLC-MSD Tof (objectif 1), il y a eu description des caractéristiques clés des

courbes cinétiques iohexol et iodixanol pour l'ensemble des sujets et pour chacun des groupes de sujets, qui ont été illustrées graphiquement.

### *2.8.2 Analyse de comparaison*

La phase d'élimination des courbes cinétiques des molécules iohexol et iodixanol a permis, à l'aide de calculs pharmacocinétiques, d'évaluer les clairances de ces molécules (objectif 2A et 2B) chez les sujets.

Le coefficient de variation (CV) est le paramètre qui a été évalué afin de déterminer les variations de la méthode de dosage de la pCys C.

#### *Coefficient de corrélation de Pearson*

L'évaluation des comportements des marqueurs conventionnels de filtration glomérulaire et celui de la clairance de l'iodixanol à l'étalon d'or « la clairance de l'iohexol » (objectif 2C) a été déterminée par des analyses bivariées. Le coefficient de corrélation  $r$  de Pearson a été calculé lors de ces comparaisons. Les comparaisons ont aussi été illustrées graphiquement pour chacun des groupes de sujets ainsi que pour l'ensemble des sujets.

## 2.9 Considérations éthiques

Le projet de recherche a été présenté et approuvé par le Comité d'éthique de la recherche de HCLM en janvier 2005.

La participation des sujets à la recherche était une participation volontaire, c'est-à-dire libre et éclairée basée sur les éléments de la déclaration d'Helsinki (Doucet, 2002). Le sujet n'a pas tiré d'avantage lors de sa participation. Dès le début de l'échange avec le chercheur, le sujet était informé qu'il pouvait se retirer en tout temps par un simple avis verbal sans aucun préjudice en ce qui a trait aux soins médicaux à recevoir par son médecin traitant et que si des prélèvements sanguins avaient été déjà recueillis dans le cadre de l'étude, ils seraient complètement détruits ainsi que tout autre renseignement le concernant.

Un formulaire de consentement a été remis au sujet (annexe I). Les éléments qui concernaient le bien-être physique et psychologique du sujet étaient indiqués ainsi que ceux concernant le contexte du projet, les bienfaits attendus, les populations participantes donc, en d'autres termes, l'ensemble du protocole de recherche était rappelé au sujet dans ce formulaire. Toutefois, pour participer au projet de recherche, le sujet était informé qu'il devait donner son consentement et signer le formulaire de consentement (annexe I). Le sujet pouvait s'exprimer en français ou en anglais tant à l'oral qu'à l'écrit.



La confidentialité de l'identité des sujets de recherche a été assurée et respectée durant toutes les étapes du projet de recherche. Il y a eu dénominalisation de l'identité des sujets dans les documents analysés par attribution d'un numéro de code. La clé reliant les noms des sujets à leur code est conservée sous clé à HCLM et seul le chercheur principal y avait accès.

Outre les prélèvements sanguins supplémentaires, le projet de recherche ne pouvait exposer le sujet à des risques autres que ceux de l'intervention d'angiographie elle-même. Le remplacement de 5 mL de l'iodixanol par de l'iohexol ne pouvait pas causer plus de néphrotoxicité que l'utilisation seule de l'iodixanol. Par ailleurs, il est très rare que des prélèvements sanguins causent des inconvénients. Toutefois, lorsque c'était possible, un cathéter était suggéré au sujet et laissé en place afin de réduire le nombre de ponctions veineuses. Puis, dans la mesure du possible, les prélèvements nécessaires à la mesure de la clairance d'iohexol et de la cystatine C étaient faits lorsque le sujet devait subir des prélèvements sanguins pour des soins usuels.

Des modifications au formulaire de consentement pour certains sujets ont dû être apportées. Il est arrivé à quelques reprises que le sujet soit incapable d'inscrire ses initiales au bas des pages du formulaire de consentement ou encore d'écrire son nom en lettres moulées à la dernière page du formulaire pour les raisons suivantes : l'âge, la nervosité ou des tremblements associés à l'intervention d'angiographie. En donnant son accord

par la signature de son nom après l'énoncé du consentement, une lettre écrite par le chercheur spécifiant les raisons de l'absence des initiales du sujet ou de son nom en lettres moulées a été faite; puis, ajoutée au dossier médical du sujet.

Ainsi, le protocole de recherche, le formulaire de consentement et les échanges entre le chercheur et le sujet ont respecté tous les éléments décrits dans la déclaration d'Helsinki (Association Médicale Mondiale, 2000), le code de Nuremberg (Tribunal militaire de Nuremberg, 1947), le rapport Belmont (The National Commission for the Protection of Human Subjects on Biomedical and Behavioral Research, 1982), l'Énoncé de politique des trois Conseils (Institut de recherche en santé du Canada, Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada, Conseil de recherches en sciences humaines du Canada, 1998) et le plan d'action ministériel en éthique de la recherche et en intégrité scientifique (Ministère de la Santé et des Services sociaux, 1998).

## **QUATRIÈME CHAPITRE**

### **RÉSULTATS**

Dans cette section, le développement de la méthode analytique en CE est présenté en premier lieu. Les résultats des étapes du développement de cette méthode analytiques sont exposés ainsi que les conditions analytiques des instruments utilisés. Par la suite, les résultats obtenus auprès des sujets cliniques sont exposés selon cette ordre : caractéristiques des sujets, mesures de la créatinine et de la cystatine C plasmatique, description de la cinétique de l'iohexol et de l'iodixanol et comparaison des marqueurs de FG à l'étalon d'or la clairance de l'iohexol. À la section 2.4.1, l'article concernant le développement de la méthode en HPLC-MSD Tof ainsi que les résultats de l'étude clinique sont présentés et contiennent les mêmes éléments énumérés ci-haut.

#### **1. VALIDATION DE LA MÉTHODE DE MESURE IOHEXOL-IODIXANOL**

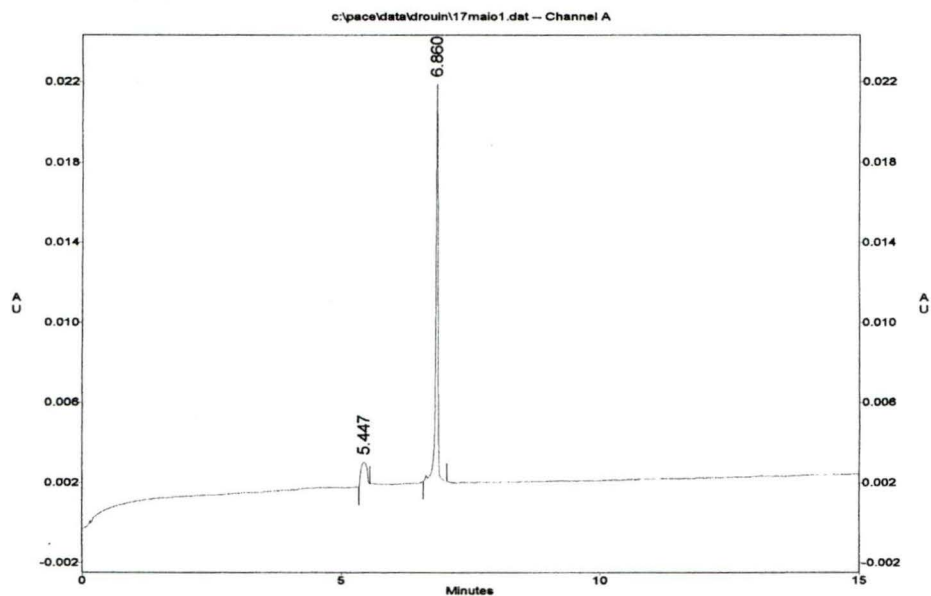
Les résultats du développement de la méthode analytique en CE sont montrés avant ceux fait par HPLC-MSD Tof.

## 1.1 Électrophorèse capillaire

Le choix de la longueur d'onde de la détection a été fait en tenant compte des caractéristiques physico-chimiques des molécules d'iohexol et d'iodixanol. La présence des noyaux aromatiques leur confère une bonne absorbance à 254 nm. Des analyses spectroscopiques UV/Visible faites à l'aide de l'instrument Ultrospect 2100 pro de la compagnie Biochrom Ltd. (Cambridge Science Park, Royaume-Uni) ont confirmé que le plasma n'interférait pas avec l'absorbance des constituants des échantillons.

Le développement de la méthode analytique en CE a été débuté par le choix du pH du tampon borate. Comme il a été mentionné dans la section 5.2.1 du deuxième chapitre, le pH joue principalement deux rôles dans la séparation de molécules en CE. Il influence d'une part le degré d'ionisation des silanols donc le flux électro-osmotique et d'autre part la charge de l'analyte, donc la mobilité électrophorétique de l'espèce. Les variations de pH vont influencer très peu la mobilité électrophorétique des deux substances de contraste car elles sont faiblement ionisables. Comme montré par les figures 18 et 19, le temps de migration a été de 6,86 minutes pour l'iohexol et de 6,94 minutes pour l'iodixanol. Une certaine complexation par les ions du tampon borate peut être responsable de la séparation et de la migration plus lente que le flux électro-osmotique; ce qui indiquerait la présence d'une charge globale négative sur les molécules.

Std.iohexol 160 mg/L sans plasma (sans albumine, NaCl et std.in)  
 Tampon borate 220 mM ; pH=8.8  
 24 kV; Détecteur 254 nm; 30 oC  
 Capillaire 57 cm t  
 File : c:\pace\data\drouin\17maio1.dat  
 Method : c:\pace\methods\marie-c.met  
 Sample ID :  
 Vial : 11  
 Volume : 15  
 Acquired : May 17, 2005 10:39:49  
 Printed : May 17, 2005 11:00:38

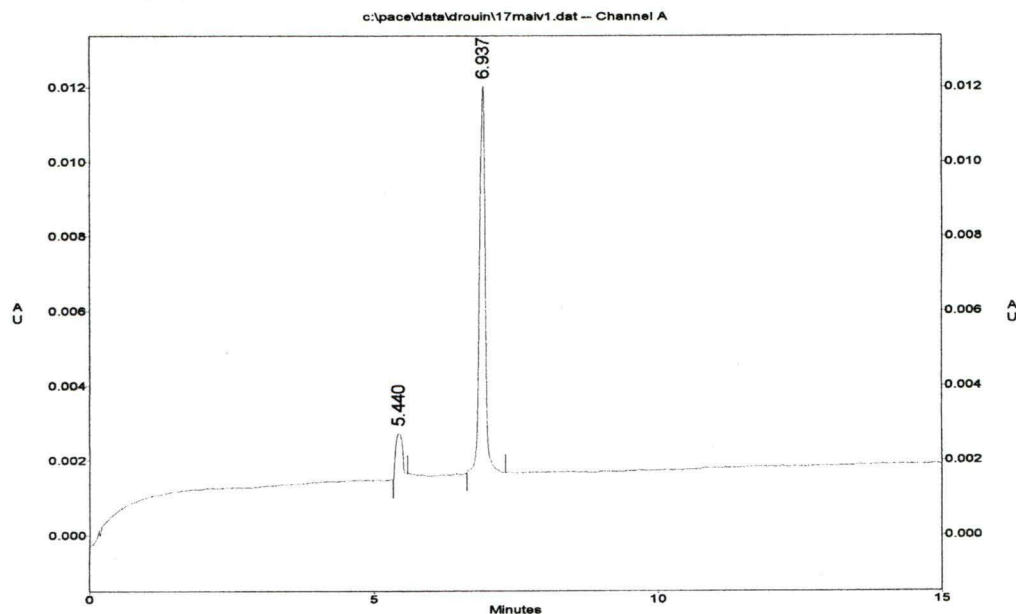


Channel A Results

Peak	Mig. Time	Area	width at 50 %	Height	Plates
1	5.45	9245	0.1408	1161	13930
2	6.86	59776	0.0420	19820	139454
Totals :		69021		20981	

Figure 18: Électrophérogramme d'un échantillon standard de 160 mg/L iohexol sans plasma.

Std.iodixanol 160 mg/L sans plasma (sans albumine, NaCl et std.in)  
 Tampon borate 220 mM ; pH=8.8  
 24 kV; Détecteur 254 nm; 30 oC  
 Capillaire 57 cm t  
 File : c:\pace\data\drouin\17maiv1.dat  
 Method : c:\pace\methods\marie-c.met  
 Sample ID : std.iodixanol 160  
 Vial : 11  
 Volume : 15  
 Acquired : May 17, 2005 11:30:11  
 Printed : May 17, 2005 11:47:21



Channel A Results

Peak	Mig. Time	Area	width at 50 %	Height	Plates
1	5.44	9439	0.1405	1168	13752
2	6.94	72743	0.1071	10360	25521
Totals :		82182		11528	

Figure 19: Électrophérogramme d'un échantillon standard de 160 mg/L iodixanol sans plasma.

En CE, afin d'améliorer la séparation, on augmente la force ionique du tampon. Malheureusement, dans notre cas, on n'a pas pu ajuster davantage ce paramètre. La concentration de 220 mM est déjà suffisamment élevée et une

augmentation supplémentaire aurait augmenté le courant électrique à des niveaux où la dissipation de la chaleur aurait été inadéquate.

L'ajout de plasma dans les échantillons a augmenté les temps de migration des molécules iohexol et iodixanol. Ainsi, pour une concentration de 160 mg/L, la migration de l'iohexol est déplacée à un temps de migration de 7,35 minutes (figure 20) comparativement à environ 6,9 minutes sans plasma.

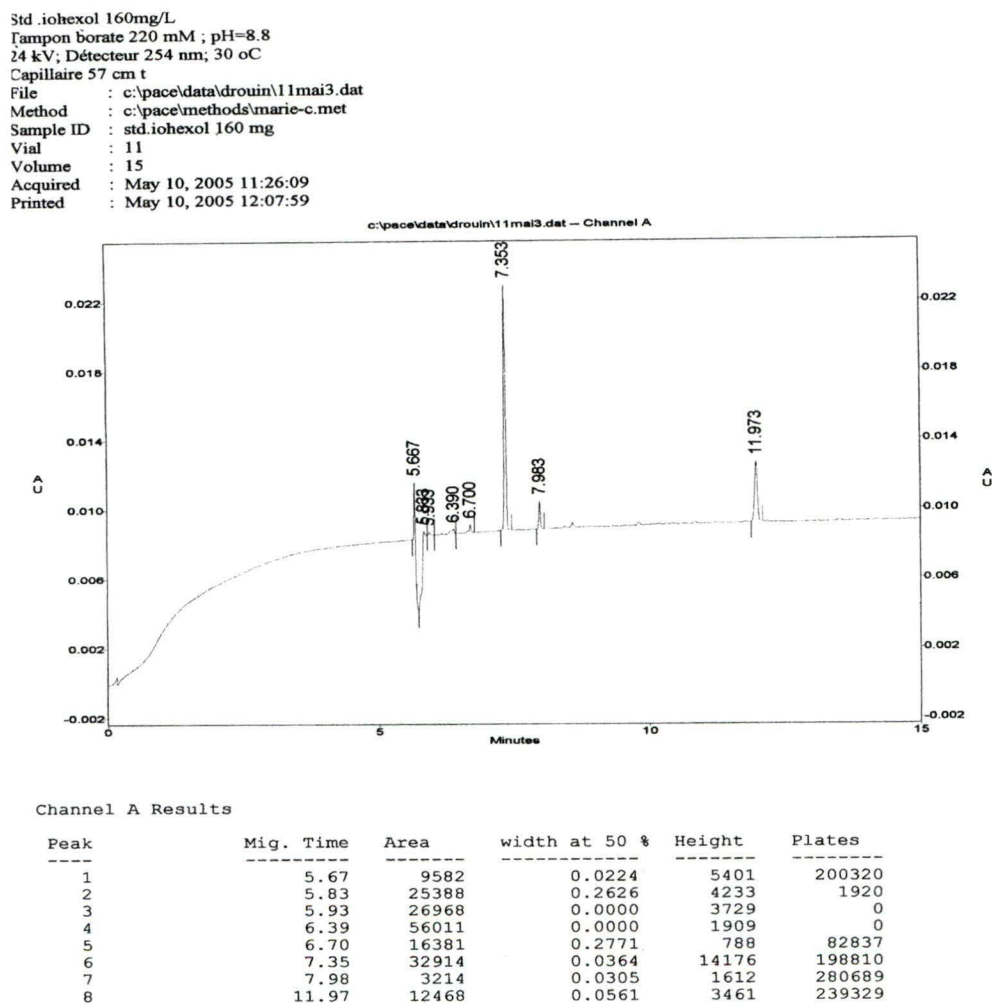
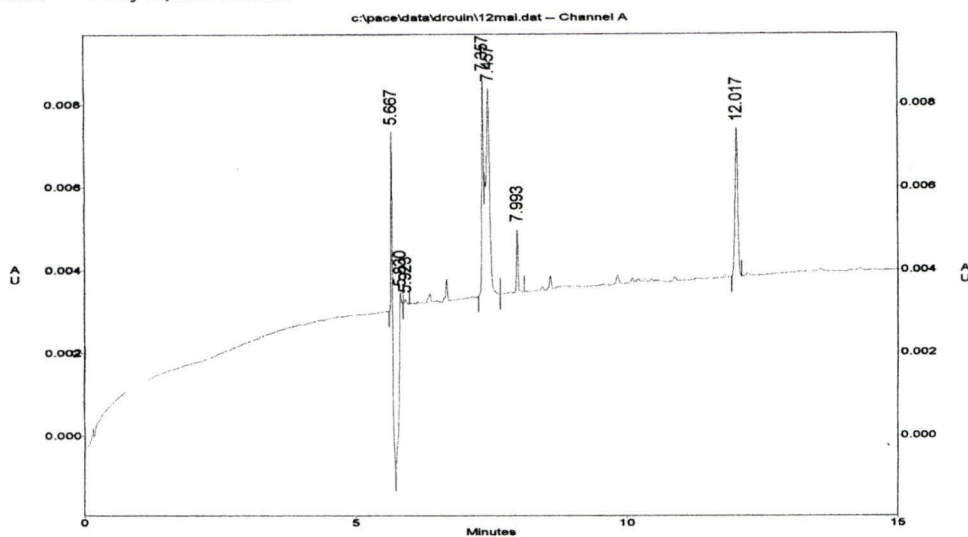


Figure 20: Électrophérogramme d'un échantillon standard de 160 mg/L iohexol avec plasma.

Dans le cas de l'iodixanol, on a aussi observé une division du signal avec des temps de migration de 7,37 et de 7,46 minutes (figure 21).

Std. iodixanol 160 mg/L  
 Tampon borate 220 mM ; pH=8.8  
 24 kV; Détecteur 254 nm; 30 °C  
 Capillaire 57 cm t  
 File : c:\pace\data\drouin\12mai.dat  
 Method : c:\pace\methods\marie-c.met  
 Sample ID :  
 Vial : 11  
 Volume : 15  
 Acquired : May 11, 2005 10:28:50  
 Printed : May 11, 2005 10:45:12



Channel A Results

Peak	Mig. Time	Area	width at 50 %	Height	Plates
1	5.67	10295	0.0212	6126	200166
2	5.83	12573	0.3443	2947	19595
3	5.92	6454	0.0000	1289	0
4	7.36	12757	0.0406	5248	119593
5	7.46	24929	0.4407	4992	63719
6	7.99	3321	0.0320	1542	338459
7	12.02	12955	0.0568	3578	238051

Figure 21: Électrophérogramme d'un échantillon standard de 160 mg/L iodixanol avec plasma.

En présence du plasma, on peut donc distinguer les deux isomères de l'iodixanol. Cela a fait en sorte que lors de l'analyse d'un mélange d'iohexol et



d'iodixanol (5 :95, v/v) dans le plasma un des isomères de l'iodixanol co-élue avec l'iohexol et rend alors la séparation quasiment impossible (figure 22).

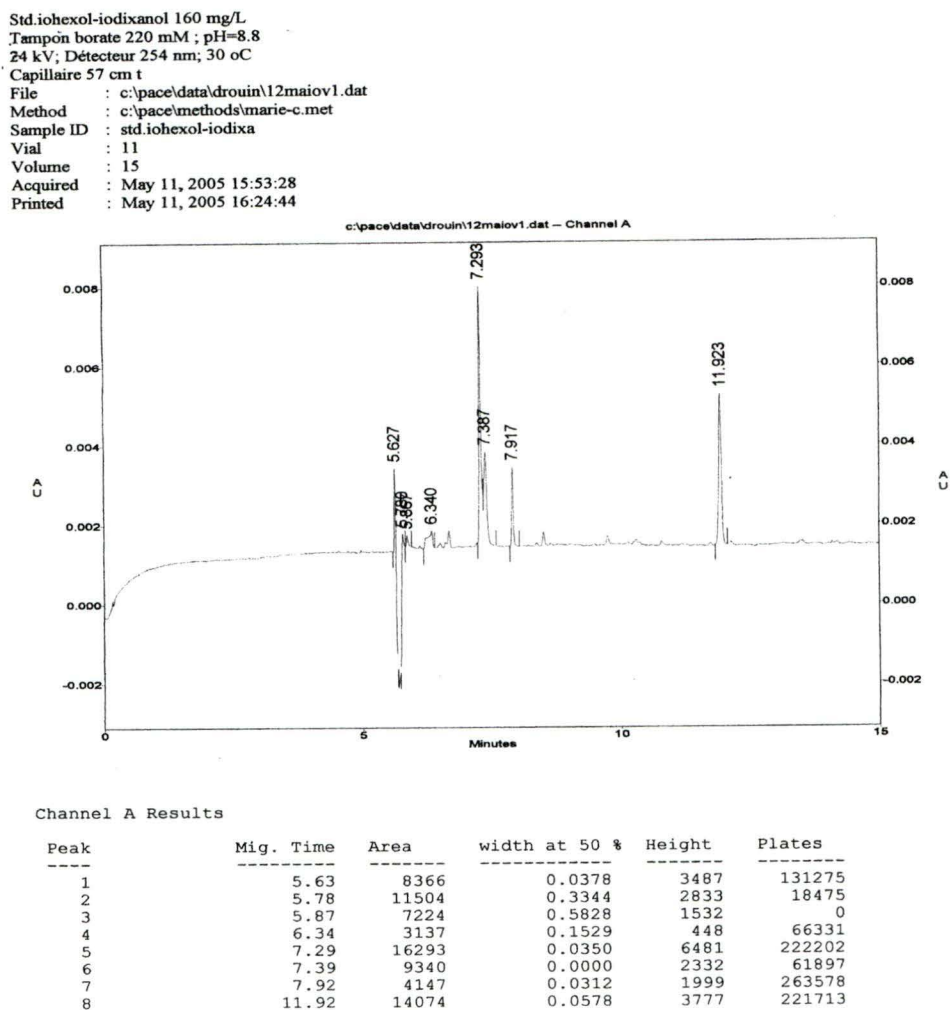


Figure 22: Électrophérogramme d'un échantillon standard de 160 mg/L d'iohexol-iodixanol avec plasma.

La température du capillaire et le voltage appliqué ont été ensuite modifiés afin de séparer l'iohexol de l'iodixanol. Ces étapes n'ont cependant pas conduit à une méthode de séparation adéquate et suffisamment robuste pour être appliquée à des fins de quantification.

C'est pourquoi, une autre méthode analytique, la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse, a été par la suite évaluée.

Puisque, la méthodologie et les résultats du principe de séparation et de quantification iohexol-iodixanol par HPLC-MSD ToF seront publiés sous forme d'article, ces parties sont présentées intégralement à la section 2.4.1 telles que dans l'article, qui a été soumis en anglais.

## 2. RÉSULTATS OBTENUS AUPRÈS DES SUJETS CLINIQUES

Les caractéristiques des sujets participants sont présentées pour chacun des groupes, soit pour 10 sujets avec une fonction rénale normale et 7 sujets avec une fonction rénale altérée. Les résultats des dosages de la créatinine et de la cystatine C sont expliqués dans les sections 2.2 et 2.3. Alors que les résultats des courbes cinétiques de l'élimination de l'iohexol et de l'iodixanol pour les deux groupes de sujets, ils se retrouvent à la section 2.4. L'article est présenté intégralement tel que soumis à la revue scientifique *Journal of Chromatography A* à la section 2.4.1. Les calculs pharmacocinétiques permettant de calculer les clairances d'iohexol et d'iodixanol sont également présentés dans la section 2.4.

### 2.1 Caractéristiques des sujets participants

Selon le tableau I, les dix sujets (sujets 1 à 10) avec une fonction rénale normale, soit une ClCrC par l'équation de Cockcroft et Gault

supérieure à 60 mL/min, formaient le premier groupe de sujets (sept hommes et trois femmes). Ils étaient âgés de 52 à 69 ans. Leur poids variait de 47,7 à 105 kg et leur taille de 1,27 à 1,86 m. Alors que sept sujets (sujets de 11 à 17) atteints d'un certain degré de dysfonction rénale (ClCrC par l'équation de Cockcroft et Gault < 60 mL/min) constituaient le deuxième groupe, soit deux hommes et cinq femmes âgés de 69 à 78 ans (tableau I). Le poids de ces derniers sujets allait de 38,0 à 81,7 kg et la taille de 1,27 à 1,73 m. Dans ce groupe les personnes sont plus âgées que dans le premier groupe. Leur poids corporel était également plus faible.

Tableau I: Données anthropométriques et facteurs de co-morbidités des sujets.

Sujets	Sexe (H/F)	Âge (années)	Poids (kg)	Taille (m)	Clairance créatinine pré-angio calculée * (mL/min)	NAC	Facteurs de co-morbidités				
							DM	HTA	MVAS	MCAS	tabac
1	H	63	91,7	1,58	76,1	+	+	-	+	-	-
2	F	62	47,7	1,67	87,8	-	-	-	-	-	+
3	H	59	89,0	1,76	173,0	+	+	+	+	+	-
4	F	52	105,3	1,27	214,0	-	-	+	-	-	+
5	H	69	81,7	1,83	96,7	-	-	-	-	-	-
6	H	65	81,7	1,67	85,1	-	-	-	+	+	+
7	F	54	56,8	1,73	113,0	-	-	+	-	+	-
8	H	69	81,0	1,73	97,1	-	-	+	-	+	-
9	H	62	88,5	1,86	89,9	-	-	-	+	-	-
10	H	56	72,6	1,55	106,0	-	-	+	-	-	+
11	H	70	81,7	1,70	58,1	-	-	+	-	-	-
12	F	70	56,8	1,39	50,2	+	-	+	-	-	-
13	F	69	64,5	1,61	55,9	+	+	+	-	-	-
14	F	74	59,0	1,61	33,9	+	+	+	+	+	-
15	F	78	52,7	1,58	25,1	+	+	+	-	-	-
16	F	78	38,0	1,27	24,1	-	-	+	+	-	-
17	H	71	57,2	1,73	43,3	-	-	-	-	-	-

\* La clairance de créatinine plasmatique pré-angio a été calculée par l'équation de Cockcroft et Gault.

NAC: N-acétyl-cystéine

DM: diabète

HTA: hypertension artérielle

MVAS: maladie vasculaire athérosclérotique

MCAS: maladie cardiaque athérosclérotique

Les facteurs de co-morbidités suivants : diabète (DM), hypertension artérielle (HTA), maladie vasculaire athérosclérotique (MVAS), maladie cardiaque athérosclérotique (MCAS) et la consommation du tabac des sujets ainsi que l'administration de la NAC sont également présentés dans ce même tableau. Les sujets ayant une fonction rénale réduite ont davantage de facteurs de co-morbidités que ceux ayant une fonction rénale normale. Toutefois, l'usage du tabac n'est pas un facteur de co-morbidité pour le groupe de patient avec une fonction rénale anormale.

Une analyse non paramétrique a été faite sur les variables anthropométriques des deux groupes de sujets afin de vérifier si les deux groupes sont comparables (tableau II). Il existe une différence très significative entre les localisations des distributions de la variable âge entre les deux groupes de sujets ( $p \leq 0,001$ ). D'après le tableau I, il est déjà possible de constater une différence d'âge entre les deux groupes de sujets. Toutefois, il n'existe pas de différence entre les deux groupes de sujets pour les autres variables anthropométriques.

Tableau II : Résultats des comparaisons non-paramétriques des variables anthropométriques des deux groupes de sujets.

Test Mann-Whitney-Wilcoxon	Variables de comparaison			
	sexe	âge	poids	taille
valeur de p (bilatéral)	0,1613	0,0002	0,0330	0,1932

## 2.2 Créatinine

Le volume total injecté de SC iodixanol a varié de 20 à 145 mL pour les sujets avec une fonction rénale normale et de 18 à 135 mL pour les sujets avec une fonction rénale réduite (tableau III). Le suivi de l'évolution de la fonction rénale a été fait avec le dosage de pCr 4 heures post-intervention, aucune élévation des concentrations de pCr n'a été remarquée entre les valeurs pré- et post-intervention chez tous les sujets de l'étude.

Tableau III: Caractéristiques des 17 sujets et évaluation pré et 4 heures post-angiographie des concentrations de pCys C et pCr.

Sujets	Sexe (H/F)	Âge (années)	Poids (kg)	Taille (m)	Volume de substance de contraste injecté (mL)		Clairance créatinine plasmatique pré-angio (mL/min)	Créatinine plasmatique (µmol/L)		Cystatine C post-4h				
					Iohexol	Iodixanol	calculée *	pré-angio	post-4h	Duplicata (mg/L)		Moyenne (mg/L)	Écart-type inter-essais (mg/L)	CV inter-essais (%)
1	H	63	91,7	1,58	5,0	60,0	76,1	116	109	0,8847	0,8900	0,8874	0,004	0,422
2	F	62	47,7	1,67	5,0	30,0	87,8	45	39	0,4351	0,4190	0,4271	0,011	2,666
3	H	59	89,0	1,76	5,0	30,0	173,3	52	48	0,2414	0,2575	0,2495	0,011	4,564
4	F	52	105,3	1,27	5,0	58,0	214,1	46	45	0,8583	0,8636	0,8610	0,004	0,435
5	H	69	81,7	1,83	5,0	23,0	96,7	75	69	0,7738	0,7738	0,7738	0,000	0,000
6	H	65	81,7	1,67	5,0	118,0	85,1	90	82	0,5966	0,6127	0,6047	0,011	1,883
7	F	54	56,8	1,73	5,0	145,0	112,7	46	44	0,3221	0,2898	0,3060	0,023	7,465
8	H	69	81,0	1,73	5,0	30,0	97,1	74	71	0,6127	0,5482	0,5805	0,046	7,857
9	H	62	88,5	1,86	5,0	20,0	89,9	96	76	0,7096	0,7258	0,7177	0,011	1,596
10	H	56	72,6	1,55	5,0	124,0	105,9	72	66	0,9269	0,9005	0,9137	0,019	2,043
11	H	70	81,7	1,70	5,0	55,0	58,1	123	119	1,1224	1,0907	1,1066	0,022	2,0257
12	F	70	56,8	1,39	5,0	70,0	50,2	84	84	1,2861	1,3019	1,2940	0,011	0,863
13	F	69	64,5	1,61	5,0	35,0	55,9	87	76	1,2438	1,2069	1,2254	0,026	2,129
14	F	74	59,0	1,61	5,0	135,0	33,9	122	101	1,3231	1,2544	1,2888	0,049	3,769
15	F	78	52,7	1,58	5,0	42,0	25,1	138	114	1,3864	1,3653	1,3759	0,015	1,084
16	F	78	38,0	1,27	5,0	60,5	24,1	104	83	1,1065	1,1118	1,1092	0,004	0,338
17	H	71	57,2	1,73	5,0	18,0	43,3	114	103	0,8794	0,8477	0,8636	0,022	2,596

\* La clairance de créatinine plasmatique pré-angio a été calculée par l'équation de Cockcroft et Gault.

### 2.3 Cystatine C

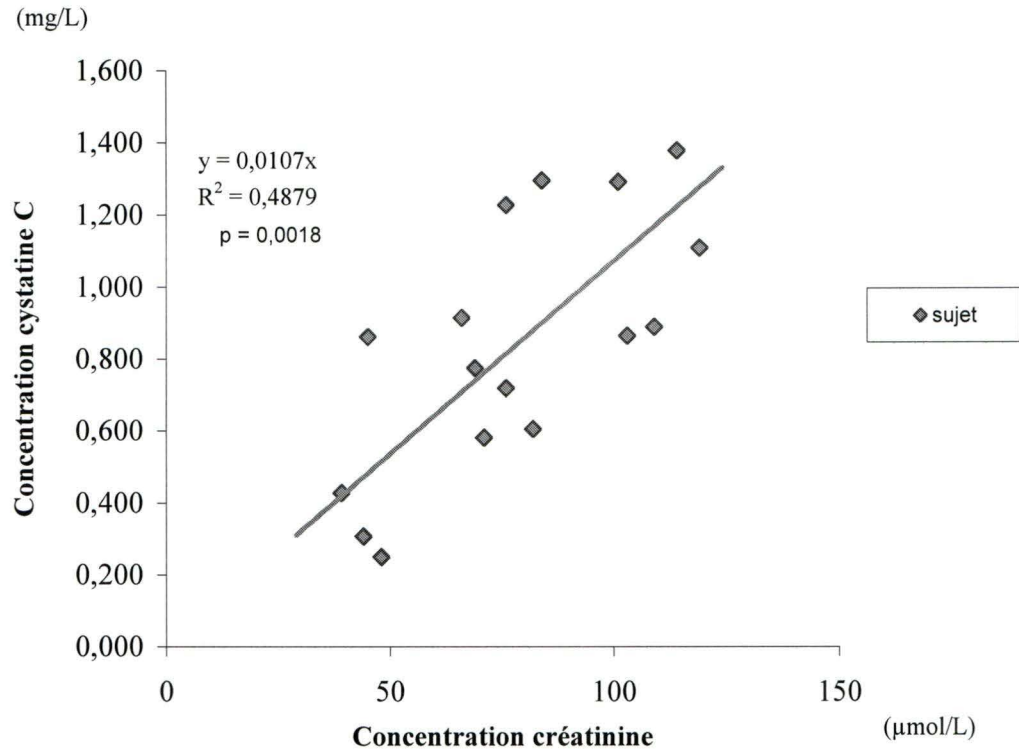
Comme il a déjà été expliqué dans la section 2.6 du troisième chapitre, un dosage de pCys C 4 heures post-intervention a été exécuté en même temps que celui de la créatinine afin de permettre la comparaison avec celui de la pCr 4 heures post-intervention. Le dosage de la pCys C a été fait en duplicata (c'est-à-dire fait à deux reprises dans la même journée; tableau III). Les CV varient de 0,000 à 7,857 % pour la pCysC inter-essais.

Étant donné que le dosage de la pCys C a été implanté au laboratoire de biochimie de HCLM pour ce projet de recherche, la fiabilité du dosage de la pCys C a dû être évaluée. La fiabilité du dosage de la pCys C a été jugée par la détermination de la corrélation entre les valeurs de concentrations de pCr et pCys C chez les 17 sujets estimée à l'aide du coefficient de Pearson. Une corrélation linéaire significative a été démontrée entre les valeurs des dosages de pCr et de pCys C, car le coefficient de corrélation de Pearson était de 0,698 (figure 23) (une valeur de  $r$  Pearson supérieure à celle établie à la section 2.3 du troisième chapitre, soit 0,591 pour l'ensemble des sujets, est considérée significative pour un seuil de signification statistique de  $\alpha$  à 5 % bilatérale) et la valeur de  $p \leq 0,05$

De ce fait, il a été possible d'évaluer dans la prochaine section le comportement de la clairance de la cystatine C ainsi que ceux des différents



marqueurs de filtration glomérulaire conventionnels utilisés en clinique; soient la pCr, ClCrC par l'équation Cockcroft et Gault et par MDRD, et celui de la clairance de l'iodixanol à l'étalon d'or « la clairance d'iohexol ».



**Figure 23 : Détermination de la corrélation entre les concentrations de cystatine C et de la créatinine pour la mesure 4 heures post-intervention chez 17 sujets.** Les dosages de cystatine C et de créatinine (voir méthodologie dans le troisième chapitre) ont été effectués chez 17 sujets devant passer une angiographie abdominale ou des membres inférieurs avec ou sans angioplastie. Les 17 sujets devaient appartenir à l'un des deux groupes suivants : le premier groupe constitué de 10 sujets qui devaient avoir une clairance rénale calculée pré-intervention supérieure à 60 mL/min alors que le deuxième groupe était composé de 7 sujets qui devaient être connus pour avoir un certain degré de dysfonction rénale ( $\leq 60$  mL/min). Ces dosages de pCys C et de pCr ont été faits 4 heures après l'intervention. Le coefficient de Pearson permet de déterminer la relation entre la concentration de protéine cystatine C et celle de la créatinine plasmatique pour la mesure post-4 heures, qui est égale à 0,698 ( $p = 0,0018$ ).



## 2.4 Cinétique de l'iohexol et de l'iodixanol

- 2.4.1 Article : « Development and evaluation of an LC-MS assay and its application for the assessment of renal function », soumis dans la revue Journal of Chromatography A.

### Development and evaluation of an LC-MS assay and its application for the assessment of renal function

**M.C. Denis<sup>2-3</sup>, K. Venne<sup>1</sup>, D. Lesiege<sup>3</sup>, M. Francoeur<sup>3</sup>, S. Groleau<sup>3</sup>,  
M. Guay<sup>2-3</sup>, J. Cusson<sup>2-3</sup>, A. Furtos<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Université de Montreal, Montreal, Canada

<sup>2</sup>Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Canada

<sup>3</sup>Hopital Charles LeMoine, Greenfield Park, Canada

Address correspondence to: Alexandra Furtos, Département de chimie, Université de Montréal, C.P. 6128, Succ. Centre-ville, Montréal (Québec), CANADA H3C 3J7, Tel. (514) 343-5614; Fax. (514) 343-7586; E-mail : [alexandra.furtos@umontreal.ca](mailto:alexandra.furtos@umontreal.ca)

### Abstract

Contrast-induced nephropathy (CIN) is a frequent and increasing cause of hospital-acquired renal failure. Chronic renal impairment, diabetes, congestive heart failure and older age were reported to be risk factors of CIN [1]. Serum creatinine level and its clearance rate are generally accepted glomerular filtration rate (GFR) markers and are commonly used to assess the renal function. However, serum creatinine measurement is not very useful to identify CIN as it often peaks 2-3 days after contrast media administration, period too long to prevent, a renal dysfunction in patients at risk. In the present study we evaluated two commonly used iodinated contrast agents, iohexol and iodixanol, as potential markers of impaired renal function. An LC-MS method has been developed in order to separate and quantify the two substances. The dynamic linear range, precision, accuracy, short term and

long term stability as well as recovery during sample preparation were evaluated. The method was subsequently applied to 17 patients scheduled for angiographic procedure displaying normal and impaired renal function. A mixture of iohexol and iodixanol was intra-arterially injected and their corresponding plasma levels were determined periodically over a 24h period following administration. The elimination of both contrast agents allowed us to discriminate between patients with normal and impaired renal function at 4, 8 and 24 hours after administration. Our preliminary results support the predictive value of iohexol and/or iodixanol clearance in a clinical environment to screen and identify patients at risk of developing CIN.

## **1. Introduction**

Nephropathy induced by contrast agents (CIN) is the third leading cause of hospital acquired renal failure [2-5]. Appropriate prevention strategies such as intravenous hydration before procedure, usage of minimum possible volume of iso-osmolar or low-osmolar media and appropriate hydration after procedure were shown to decrease the CIN incidence [6]. Serum creatinine level and its clearance rate are commonly used in clinical environment to measure the glomerular filtration rate (GFR) [7-8]. However, serum creatinine level reaches its maximum 2-3 days after contrast media administration and in subjects at risk, by that time, a renal dysfunction could already be installed [2, 9-10].

Therefore, several recent studies emphasized the need for better GFR markers, either endogenous [8, 11-16] or exogenous [17-21]. Over the last two decades, it has been shown that measuring the clearance of contrast substances used in routine radiological diagnostic procedures like iohexol (Omnipaque) [17, 20-21] provides a valid GFR assessment. The contrast substances are not metabolized, they have no target organ and their distribution follows a simple

gradient of molar concentration across the capillaries [20, 23-25]. Furthermore, their elimination is essentially renal (95 to 99 %) [21] by simple glomerular filtration without tubular renal secretion or reabsorption [20]. Using contrast substances to evaluate GFR also overcomes the problem of molecule availability as it happens when measuring inulin clearance [17-18, 20] or exposure to radioactivity when using  $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -DTPA [17, 19, 21, 26],  $^{51}\text{Cr}$ -EDTA or  $^{125}\text{I}$ -iothalamate [20]. However, when used in high doses, iohexol itself can induce nephropathy, particularly in patients with pre-existing renal insufficiency. Therefore, in clinical practice, for certain types of angiography, iohexol has been replaced by the less nephrotoxic iodixanol (Visipaque) [27-29]. Different analytical methods have been reported for determining the concentration as well as the clearance of iohexol and iodixanol [30-31]. However, to our knowledge, no study has simultaneously compared the validity of iodixanol and iohexol as GFR markers.

In the present work, in order to reduce patient's exposure to iohexol, a tracer dose of only 5 mL iohexol (Omnipaque<sup>TM</sup> 300mgI/mL) was intra-arterially infused, followed by 40-120 mL iodixanol (Visipaque<sup>TM</sup> 320mgI/mL), according to the imaging protocol. Structures of the internal standard, 7-( $\beta$ -hydroxyethyl) theophylline (hereafter called I.S.), iohexol and iodixanol are presented on Figure 1. An LC-MS method was developed and applied to simultaneously quantify the two contrast substances in plasma across seven time points after administration. Thus, the study aims first to confirm the validity of a tracer dose of iohexol as GFR marker and secondly to allow a direct comparison between iohexol and iodixanol clearance, in a clinical environment, as markers to identify patients at risk to develop CIN.

This project has been approved by the ethical research committee of Charles LeMoyne Hospital. The participation in the study was offered to two groups of patients scheduled for radiological examination with contrast

substance injection (abdominal and/or lower limbs angiography with or without angioplasty) at the request of their family physician. The first group comprised patients with normal renal function while the second group comprised patients with a decreased renal function. Individuals allergic to iodine were not allowed to participate in this study. Seventeen subjects signed a written informed consent, and were included in this project.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. Chemicals**

Iohexol, (N,N'-bis(2,3-dihydroxypropyl)5-[N-(2,3-dihydroxypropyl-acetamido]-2,4,6-triiodo-isophthalamide)), (Omnipaque<sup>TM</sup>, 300 mg I/mL) and Iodixanol, (5,5' -((2-Hydroxy-1,3-propanediyl)-bis(acetylimino))bis(N,N'-bis(2,3-dihydroxypropyl)2,4,6triiodo-1,3-benzenedicarboxamide)), (Visipaque<sup>TM</sup>, 320 mg I/mL) were kindly provided by Amersham Health Inc. (Oakville, Ontario, Canada). I.S. was purchased from Sigma-Aldrich (99.8% pure, St.Louis, USA), and used without further purification. HPLC-grade acetonitrile and Optima grade water were from Fisher Scientific (New Jersey, USA). Formic acid was purchased from Fluka (Steinheim, Germany) while Amicon 10 000 Da cut-off filters were purchased from Millipore (Bedford, USA). Vacutainer tubes were from BD Vacutainer Systems Ltd (Franklin Lakes, USA).

### **2.2. Sample preparation**

Pooled human blank plasma from the biochemistry laboratory of Charles LeMoyne Hospital spiked with an iohexol-iodixanol mixture was used for method development.

### *Preparation of stock solutions*

The iohexol/iodixanol stock solution was prepared by mixing Omnipaque™, 300 mgI/mL and Visipaque™, 320 mgI/mL in a 5:95, v/v ratio. Deuterated contrast agents are extremely expensive and rather difficult to obtain. Therefore, an alternative I.S. had to be found. We choose (7-( $\beta$ -hydroxyethyl) theophylline), a synthetic caffeine derivative, absent in the plasma and which behaves from the chromatographic and extraction point of view, similar to iohexol and iodixanol. The I.S. stock solution was prepared freshly everyday by dissolving 10.0 mg of I.S. in 50 mL Optima-grade water.

### *Sample collection*

Seven blood samples (7 mL each) were collected from the subject's cubital vein at 0, 1, 2, 3, 4, 8 and 24 hours after angiography, and used to measure the iohexol and iodixanol level. When possible, a small catheter was set up in the cubital vein in order to reduce the number of venous punctures. Blood samples were collected in sterile Vacutainer tubes. They operate in vacuum conditions and do not contain any conservation agent that could interfere with the subsequent LC-MS measurements. Blood samples were centrifuged at 3000 x g for 15 minutes, at 24°C. Supernatant plasma was transferred into 1mL eppendorf tubes and stored at 4°C if quantitative analysis was performed within 48 hours. Otherwise, plasma samples were kept frozen at -80°C until used.

### *Extraction procedure*

In order to eliminate, prior to LC-MS analysis, high molecular weight species from plasma, a filtration step has been introduced in the sample preparation process. A 250  $\mu$ L plasma aliquot (for either calibration standard, QC or clinical plasma sample) was mixed with 250  $\mu$ L Optima grade water and 5  $\mu$ L I.S. solution. The whole sample was vortexed for 30 s then

transferred to an Amicon 10 000 Da cut-off filter and centrifuged at 5000 x g under cooling conditions (4°C) for 180 min. Aliquots of the flow through were injected into the LC-MS system. Additional dilution steps (with Optima grade water) were performed for early points of the clearance curves.

#### *Preparation of quality control samples*

Quality control samples (QC) were prepared at three different concentration levels: 0.3 µmol/L iohexol and 3.1 µmol/L iodixanol (low level), 4.9 µmol/L iohexol and 49.3 µmol/L iodixanol (middle level), and 9.7 µmol/L iohexol and 98.7 µmol/L iodixanol (high level) by spiking plasma samples with appropriate volumes of internal standard and iohexol-iodixanol stock solutions. QCs were freshly prepared and run interlaced with actual samples.

#### *Calibration curve*

Pooled plasma samples spiked with the internal standard and appropriate volumes of the iohexol/iodixanol stock solution were used to simultaneously generate calibration curves for the two contrast products. Eight calibration standards ranging from 0.06 µmol/L to 9.7 µmol/L iohexol and 0.6 µmol/L to 98.7 µmol/L iodixanol in pooled plasma were prepared in duplicate. Samples were run from low to high concentration and each standard was assessed in duplicate.

### **2.3. Liquid chromatography-mass spectrometry method**

Separations were performed on an 1100 LC system coupled to an ESI-MSD-TOF mass spectrometer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). The chromatographic column was a Zorbax Eclipse XDB-C18, 4.6 x 150 mm, 5 µm particle size (Agilent Technologies, Wilmington, DE) maintained at 40°C and operated at 0.5 mL/min. The initial mobile phase (0.1 % formic acid in

water) was maintained for the first 4 minutes and during this time the post-column flow was diverted to waste in order to avoid sending into the mass spectrometer any unretained residual salts or hydrophilic small molecules from plasma. A two step linear acetonitrile gradient was used for elution. The acetonitrile concentration was increased from 0 to 40 % over 5 min then from 40 to 80 % over the next 2 min followed by an equilibration step with the initial mobile phase composition for a total run time of 17 minutes. The mass spectrometer was operated in positive electrospray mode with a dual spray configuration allowing for internal calibration and therefore a very good mass accuracy. This allowed us to extract narrow mass range peaks for quantitation purposes and thus, increase the selectivity of the method. Mass spectra were acquired from  $m/z$  100 to 2000 with an acquisition cycle of 0.89 s and a resolution greater than 10000. The electrospray voltage was set at 4 kV, the fragmentor at 200 V and the source temperature at 300°C.

## **2.4. Validation**

Validation of the LC-MS method was carried out following the “Bioanalytical Method Validation” FDA guidelines and GBPs [32-33]. The parameters evaluated through the validation were the selectivity, specificity, accuracy, precision, dynamic (linear) range, sample preparation recovery and stability assays. The acceptance criterion was  $\pm 15\%$  data deviation from nominal values except at the lowest limit of quantitation (LLOQ), where it was set at  $\pm 20\%$ .

### *Specificity and selectivity*

The lack of chromatographic interference from plasma components was investigated by comparing chromatograms of blank and spiked plasma samples. The LLOQ was determined as 10 times the noise level on blank

samples while the LLOD was determined as 3 times the noise level on blank samples.

#### *Accuracy and precision*

Five replicates of QC samples at three concentration levels of iohexol and iodixanol in pooled plasma were prepared and analysed by LC-MS in two different occasions.

#### *Recovery*

The extraction recovery of iohexol and iodixanol was determined at three different levels of iohexol and iodixanol spiked into human plasma. The results were compared with the same concentration levels prepared in water.

#### *Stability*

Analyte stability during sample collection and handling after long-term (frozen at the intended temperature) and short-term (bench top, room temperature) storage as well as stability after going through freeze and thaw cycles was evaluated. Three concentration levels of iohexol and iodixanol were investigated.

Samples were tested after three freeze ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) and thaw (room temperature) cycles. Bench-top stability for 5h in plasma (exceeding the routine sample preparation time) was determined in duplicate at three different concentrations. The stability of iohexol, iodixanol and I.S. at room temperature, at  $4^{\circ}\text{C}$  and at auto-sampler temperature ( $10^{\circ}\text{C}$ ) was also evaluated for time intervals of 24 and 48 hours. Long-term stability (15 days) of iohexol, iodixanol and I.S. was evaluated for QC samples at three different concentration levels.



### 3. Results and discussion

#### *LC-MS Separation*

Representative extracted ion chromatograms of iohexol, iodixanol and I.S. are shown in Figure 2. The total HPLC-MS analysis time was 17 min and iohexol, iodixanol and I.S. eluted at 10.2 min, 10.8 min and 11.3 min, respectively. Two peaks corresponding to different isomers eluting at 10.8 min and 10.95 min were observed for iodixanol as shown in Figure 2B. In order to maintain a simple data processing, only the first peak of the two was integrated and taken into account for quantitation purposes.

Positive electrospray mass spectra of the protonated species  $[M+H]^+$  are observed at  $m/z$  821.9,  $m/z$  1550.7 and  $m/z$  225.1 for iohexol, iodixanol and the I.S. respectively (Figure 3). Dotted lines represent the theoretical isotopic pattern and satellites peaks accompanying the most abundant isotopes are artefact of the detection system. A good agreement between the expected and the experimental  $m/z$  values was obtained for all compounds examined.

As shown on Figure 4, no interference was observed in blank plasma samples for the targeted compounds. The peak at  $m/z$  822.01, detected in all plasma samples, is easily distinguished from iohexol,  $m/z$  821.90 due to the high resolution of the MSD-ToF instrument.

#### *Method validation*

Iohexol calibration showed a good linear response for concentrations ranging from 0.06 to 9.7  $\mu\text{mol/L}$  with an  $r^2$  of 0.9993. The calibration curve of iodixanol was linear from 0.62 to 49.3  $\mu\text{mol/L}$  with an  $r^2$  of 0.9987. The

LLOQs defined as 10 times the background noise were 0.0205  $\mu\text{mol/L}$  and 0.407  $\mu\text{mol/L}$  for iohexol and iodixanol respectively.

Data for precision and accuracy of the method for iohexol and iodixanol quantitation are presented in Table 1. All these parameters are within the limits suggested by the FDA. Recovery of iohexol from plasma samples ranged from 84.4 % to 112.8 % while recovery of iodixanol ranged from 91.6 % to 108 %, as shown in Table 2.

The post-preparative stability showed that iohexol and iodixanol were stable in the sample extract when kept at 4°C or at 10°C in the autosampler for 24 hours. The stability of iohexol and iodixanol evaluated for 24 hours at room temperature revealed a 10.0 % loss in concentration. The long-term stability tests indicated that storage of plasma samples containing iohexol and iodixanol at -20°C or at -80°C is adequate for up to 15 days. Samples kept for 30 days at -20°C or at -80°C showed a loss of concentration of about 20.0 % for both iohexol and iodixanol. The results of freeze/thaw cycles indicated that the two contrast substances in human plasma lost approximately 5.0 % of their concentration after the first cycle, 10.0 % after the second and 15.0 % after the third.

#### *Patient samples*

The method described above was successfully applied to analyze plasma samples obtained from 10 subjects with normal renal function and 7 subjects with a decreased renal function. Figures 5 and 6 illustrate a similar elimination profile for iohexol and iodixanol. A rapid decrease occurs in the first 5 hours for the patients with a normal renal function (Figures 5 A and 6 A) while the decrease is less pronounced for patients with impaired renal function (Figures 5 B and 6 B). Consequently, the contrast substances elimination profile

distinguished well the two groups of subjects. For iohexol, at 4 hours post bolus administration, all subjects in the group with normal renal function had concentrations lower than 55.0  $\mu\text{mol/L}$  (Figure 5 A) while most of the patients in the group with a decreased renal function had concentrations above this value (Figure 5 B). Iohexol plasma concentration 24 hours post bolus allowed to discriminate even better between the two groups. Patients with renal dysfunction had concentrations about 10 times higher than those with normal renal function (see insets). As for iodixanol, large differences in the injected quantity along with administration of successive doses made data interpretation more challenging. Patients with suspected renal dysfunction were administered much smaller volumes of iodixanol, thus explaining the low initial concentrations observed on Figure 6 B compared to Figure 6 A. Iodixanol plasma levels 24 hours post-angiography are less influenced by the initial amount injected and allowed to discriminate patients according to their renal function (see insets).

Iohexol plasma clearance was calculated using the data from Figure 5 applied to a two-compartment kinetic model. Our results, presented on Figure 7, show that iohexol clearance is a valid marker to separate patients in two distinct groups according to their renal function. Large variations from patient to patient in the quantity of Iodixanol injected as well as the mode of administration (multiple bolus and continuous doses) prevented us from applying the same model for Iodixanol plasma clearance calculation.

#### **4. Conclusions**

In the present study we evaluated two commonly used iodinated contrast agents, iohexol and iodixanol, as potential markers of impaired renal function. Our approach showed excellent analytical performance in terms of precision,

accuracy, short term and long term stability as well as recovery during sample handling. The whole analysis, including sample preparation and LC-MS separation, can be completed within few hours. Furthermore, the study was realized in a context which takes into account the clinical reality, that is the ambulatory care, the procedures of interventions in medical imaging and actual substances of contrast used in angiography.

We demonstrated that iohexol clearance is an excellent GFR marker even when administered in a small tracer dose and even when co-administered with another contrast agent, iodixanol in our case. Kinetic parameters are also accessible during medical imaging by simple blood sample analysis. Actually, a single measurement taken either 4 or 24 hours after iohexol administration seems sufficient to reveal persistent levels of iohexol in circulation that can be correlated with existing renal insufficiency. Moreover, this parameter is independent from factors such as the age, weight and serum creatinine level. Concretely, this approach would enable the family physician to identify beforehand subjects at risk of CIN. When prescribing an imaging procedure by contrast substances a serum creatinine measurement is now required. An iohexol measurement 4 or 24 hours after 5 mL bolus administration, shown very reliable for renal function assessment, could accompany and eventually replace this pre-imaging test.

### **Acknowledgements**

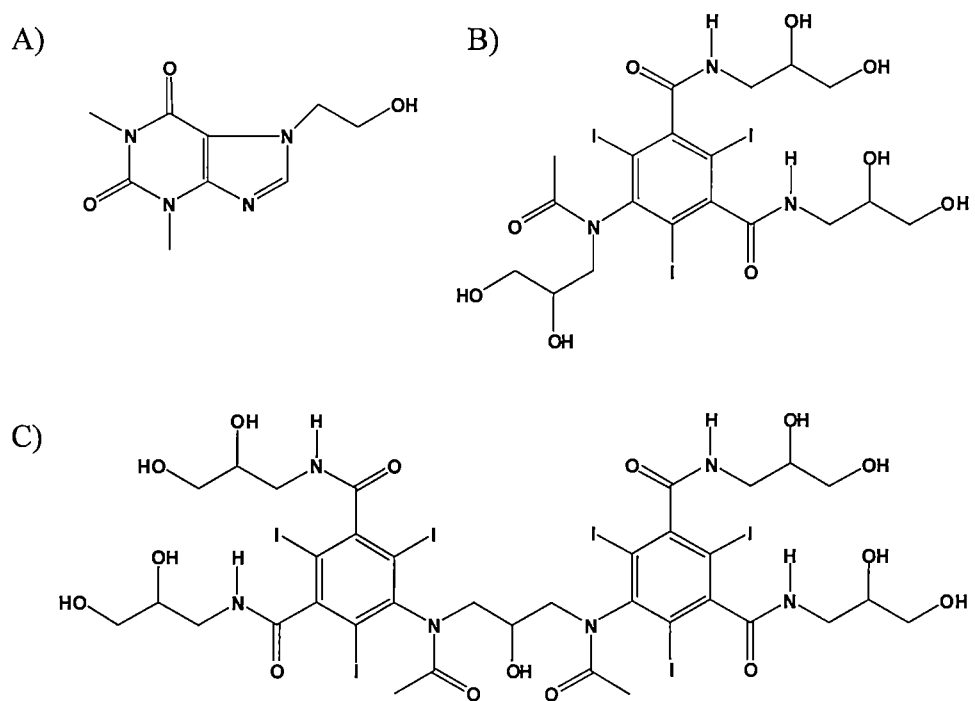
The authors would like to thank Amersham for kindly providing iohexol and iodixanol for method development purposes. MCD acknowledges “La Fondation de l’Hôpital Charles LeMoyne” for financial support.

## Figure captions

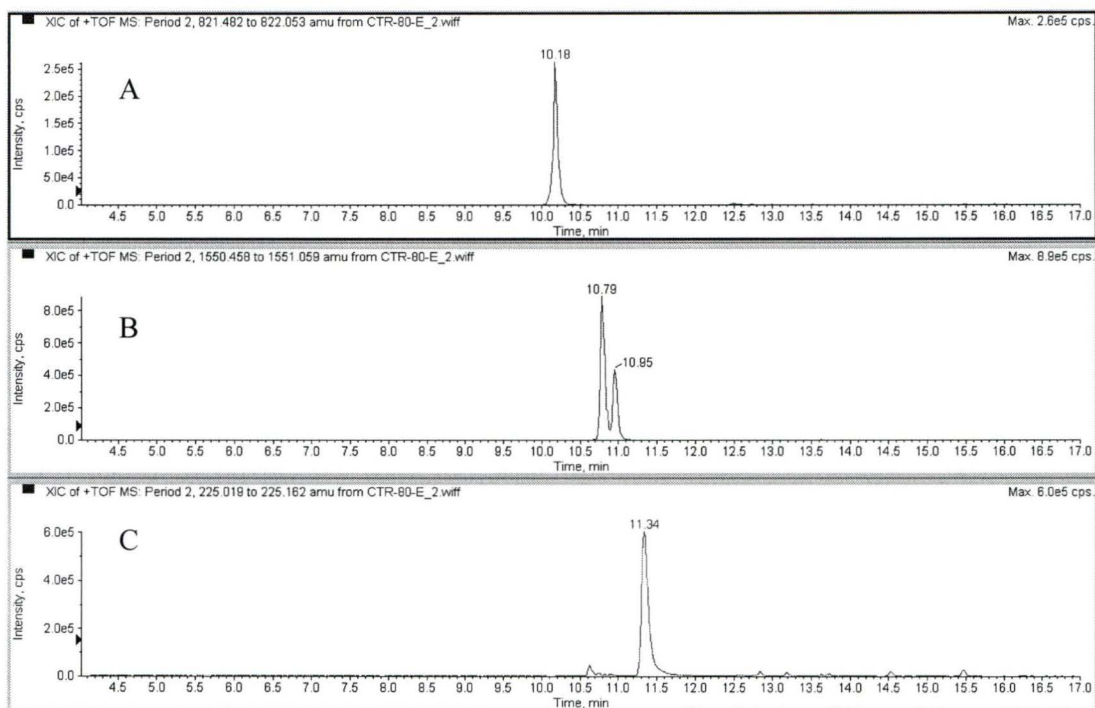
- Figure 1** Structures of the internal standard A), iohexol B) and iodixanol C).
- Figure 2** Extracted ion chromatograms of iohexol A), iodixanol B) and I.S. C) of plasma spiked with 4.86  $\mu\text{mol/L}$  iohexol and 49.3  $\mu\text{mol/L}$  iodixanol.
- Figure 3** Mass spectra of iohexol,  $m/z$  821.89, A), iodixanol,  $m/z$  1550.72, B) and I.S,  $m/z$  225.10, C) obtained with positive ion electrospray ionisation.
- Figure 4** Extracted ion chromatograms of iohexol A), iodixanol B) and I.S. C) in blank plasma sample. Doted lines represent theoretical  $m/z$  of the respective compounds.
- Figure 5** Time profile of iohexol plasma concentration in subjects with normal renal function A) and subjects with decreased renal function B). Enlargements of the 24 hours time points are represented in the insets.
- Figure 6** Time profile of iodixanol plasma concentration in subjects with normal renal function A) and subjects with decreased renal function B). Enlargements of the 24 hours time points are represented in the insets.
- Figure 7** Iohexol clearance rate in subjects with normal renal function and subjects with decreased renal function.

## Figures

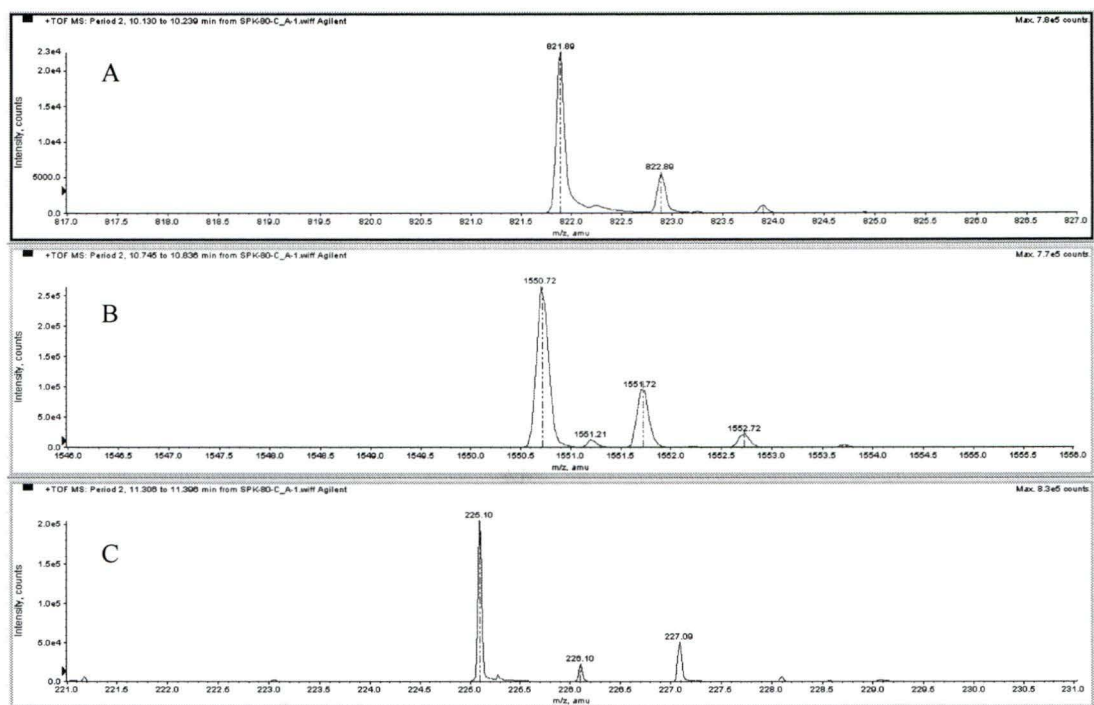
Figure 1



**Figure 2**

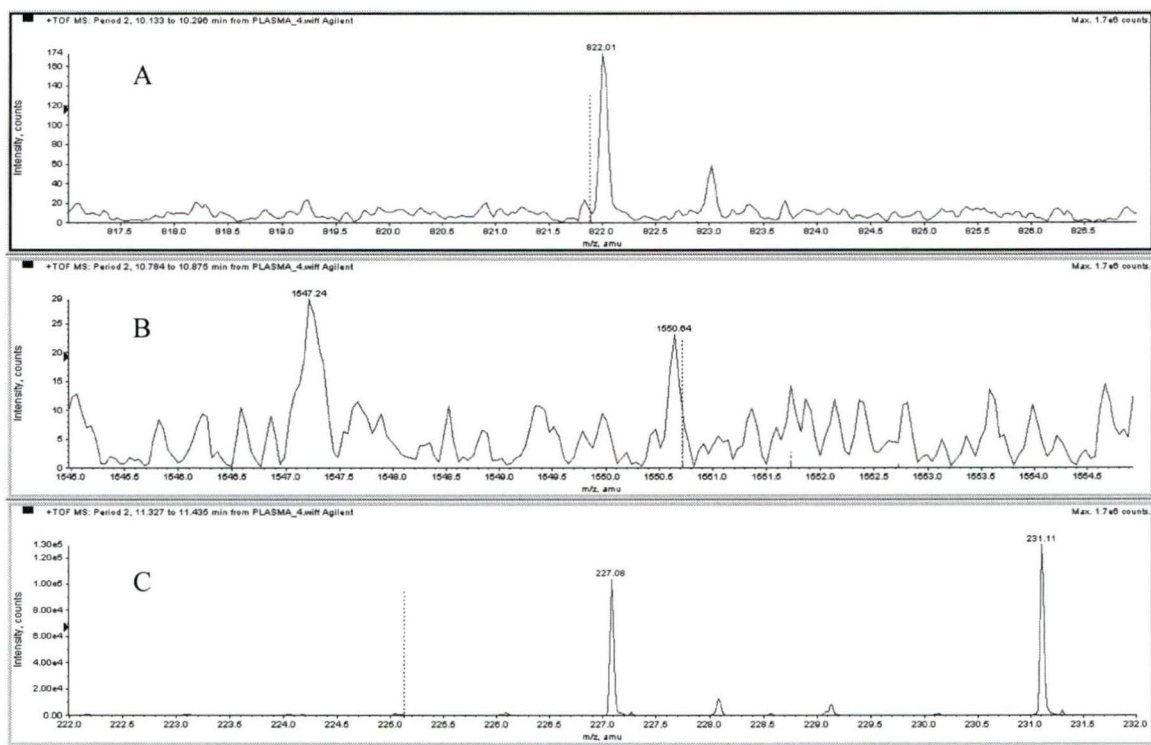


**Figure 3**

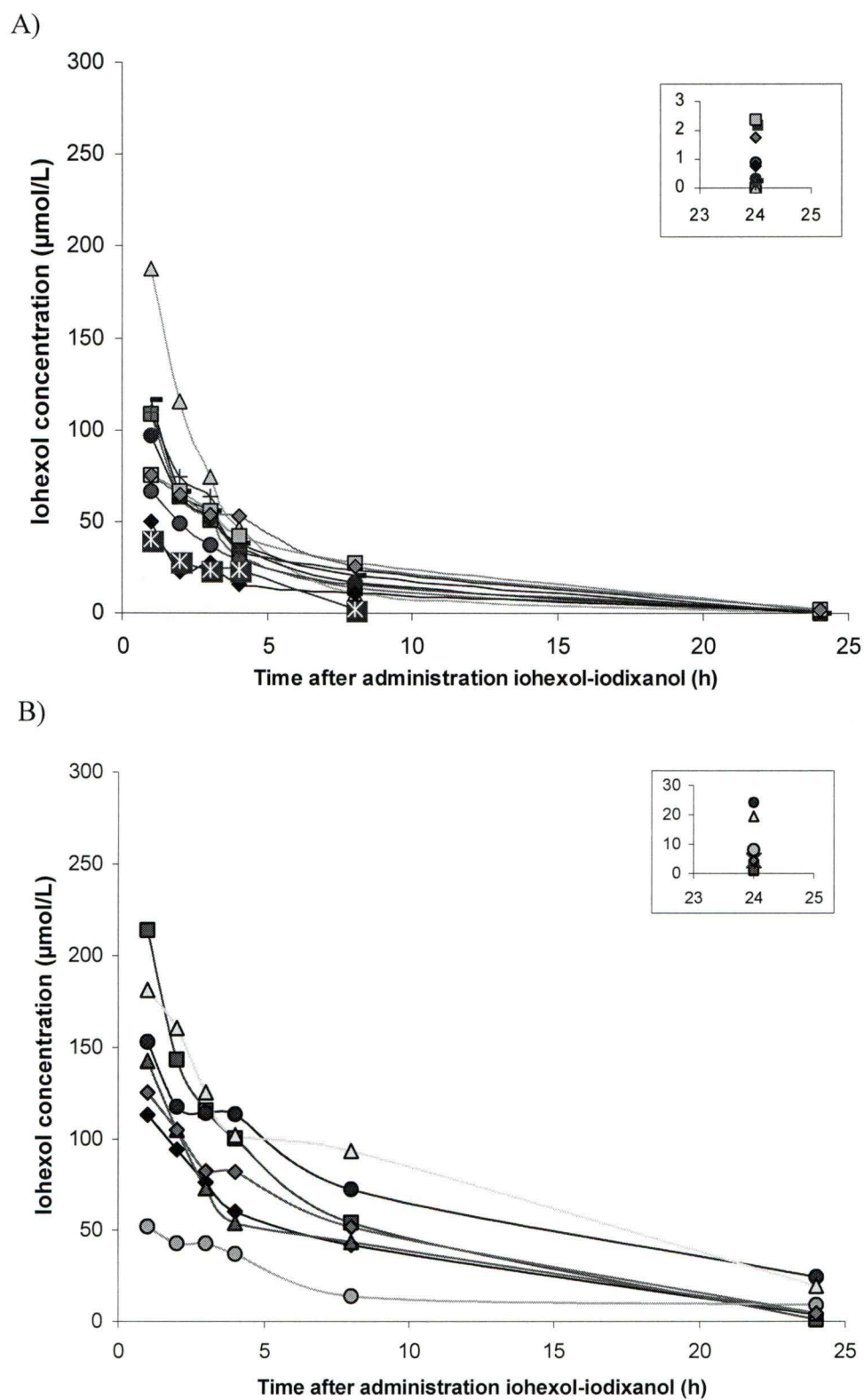




**Figure 4**

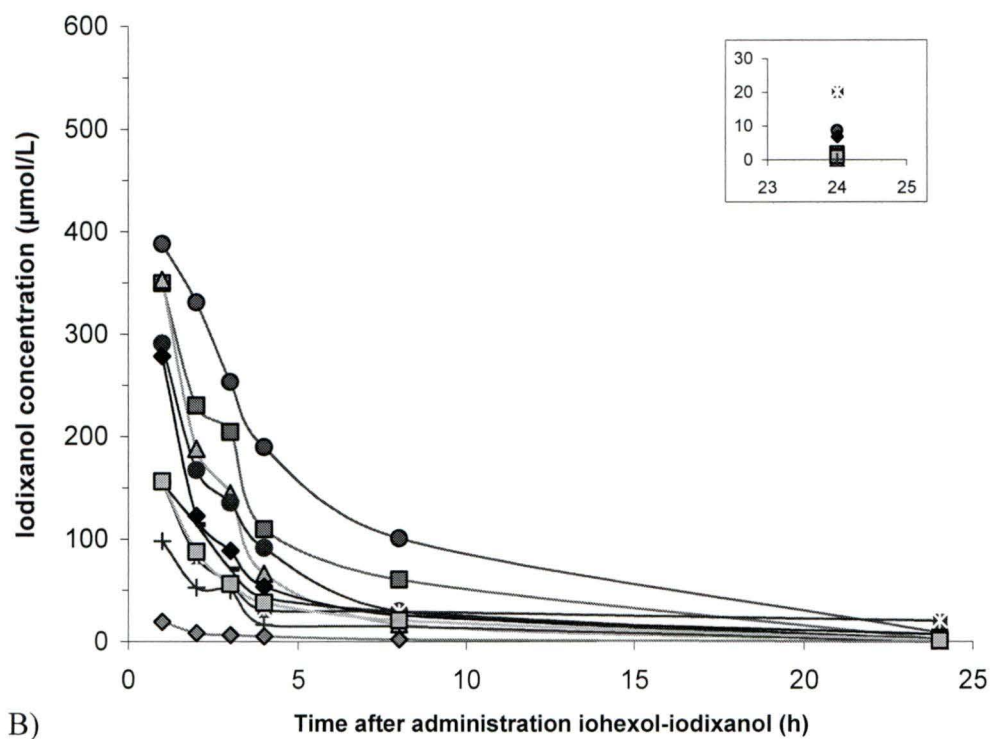


**Figure 5**



**Figure 6**

A)



B)

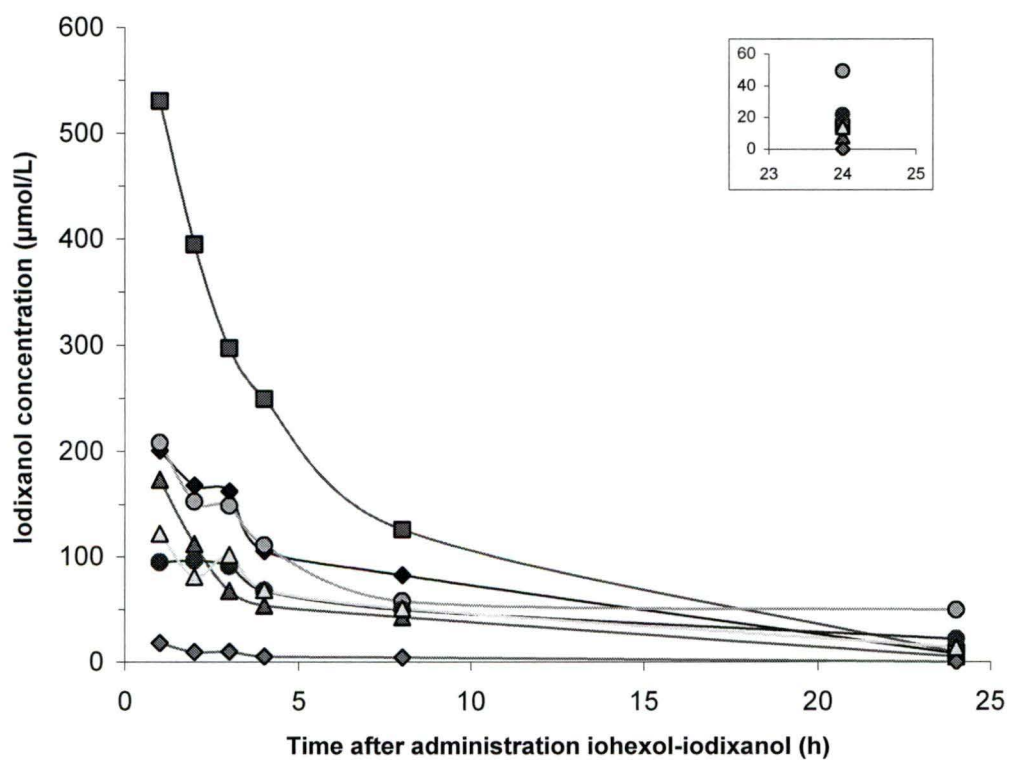
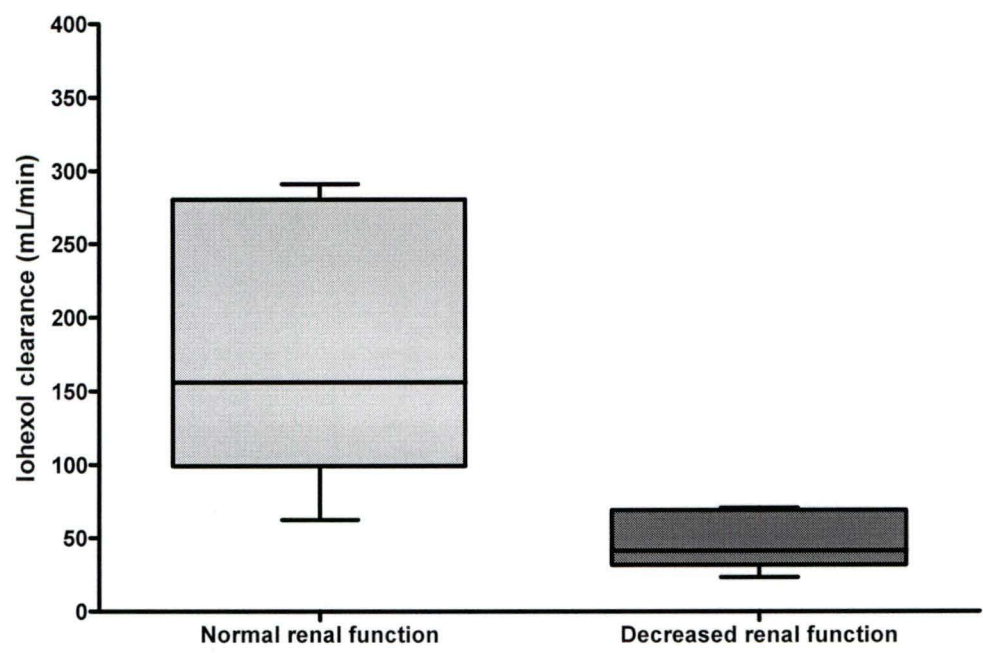


Figure 7



**Table 1** Accuracy and precision for iohexol and iodixanol measurement in plasma.

Analyte	Concentrations ( $\mu\text{mol/L}$ )	Number of observations	Measured concentrations		Accuracy (%)
			Mean ( $\mu\text{mol/L}$ )	RSD (%)	
Iohexol	Inter-assay				
	0.304	5	0.337	6.61	111
	4.86	5	4.88	10.7	100
	9.73	5	10.7	11.5	110
	Intra-assay				
	0.304	5	0.354	13.6	116
	4.86	5	4.91	11.5	101
	9.73	5	9.70	3.06	99.7
Iodixanol	Inter-assay				
	3.08	5	3.07	5.31	99.7
	49.3	5	49.9	12.7	101
	98.7	5	102	7.13	103
	Intra-assay				
	3.08	5	3.07	4.32	99.7
	49.3	5	49.6	11.4	101
	98.7	5	90.8	5.6	92

**Table 2** Recovery of iohexol and iodixanol from plasma.

Matrix	Analyte	Concentrations ( $\mu\text{mol/L}$ )	Number of observations	Measured concentrations ( $\mu\text{mol/L}$ )	Recovery (%)
plasma	Iohexol	0.304	2	0.328	112.8
		4.86	2	4.10	84.4
		9.73	2	8.94	91.9
	Iodixanol	3.08	2	2.82	91.6
		49.3	2	48.3	98.0
		98.7	2	107	108

## References

- [1] M. Tepel, P. Aspelin, N. Lameire, *Comp Cardiol Can.* 3 (2006) 37.
- [2] P.A. McCullough, *Rev Cardiovasc Med.* 4 (suppl 1) (2003) s2.
- [3] E. Levy, C. Viscoli, R. Horwitz, *JAMA.* 275 (1996) 1489.
- [4] P. McCullough, R. Wolyn, L. Rocher, R. Levin, W. O'Neil, *Am J Med.* 103 (1997) 368.
- [5] H. Rickli, K. Benou, P. Ammann, T. Fehr, H.P. Brunner-La Rocca, H. Petridis, W. Riesen, R.P. Wuthrich, *Clin Nephrol.* 61 (2) (2004) 98.
- [6] P.B. Persson, A. Patzak, *Nephrol Dial Transplant.* 20 (suppl 1) (2005) i2.
- [7] H. Thomsen, Guidelines for contrast media from the European Society of Urogenital Radiology, *AJR.* 81 (2003) 1463.
- [8] P. McCullough, K.A. Sandberg, *Cardiovasc Med.* 4 (suppl 5) (2003) s3.
- [9] B.J. Barrett, P.S. Parfrey, *N Engl J Med.* 331 (21) (1994) 1449.
- [10] S. Murphy, B.J. Barrett, *J Am Soc Nephrol.* 11 (2000) 117.
- [11] U. Hoffmann, M. Fischereder, B. Krüger, W. Drobnik, B.K. Krämer, *J Am Soc Nephrol.* 15 (2004) 407.
- [12] J. Lin, J.V. Bonventre, *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 14 (2005) 105.
- [13] D. Massey, *J Clin Lab Anal.* 18 (2004) 55.
- [14] R. Solomon, *Kidney Int.* 53 (1998) 230.
- [15] X. Xu, J. Zou, X. Ding, D. Xin, Y. Ren, *J Clin Lab Anal.* 18 (2004) 61.
- [16] A.O. Grubb, *Adv Clin Chem.* 35 (2000) 63.
- [17] S.C.W. Brown, P.H. O'Reilly, *J Urol.* 146 (1991) 675.
- [18] F. Gaspari, N. Perico, P. Ruggenenti, L. Mosconi, C.S. Amuchastegui, E. Guerini, E. Daina, G. Remuzzi, *J Am Soc Nephrol.* 6(2) (1995) 257.

- [19] H. Effersöe, P. Rosenkilde, S. Groth, L.I. Jensen, K. Golman, *Invest Radiol.* 25 (7) (1990) 778.
- [20] B. Frennby, Thesis from the department of diagnostic radiology. University of Lund, Sweden, 1996, 3.
- [21] E. Krutzen, S.E. Back, I. Nilsson-Ehle, P. Nilsson-Ehle, *J Lab Clin Med.* 104 (1984) 955.
- [22] S-Y. Lee, M.R. Chun, D.J. Kim, J.W. Kim, *J Chromatogr B.* 839 (2006) 124.
- [23] T. Aakhus, C. Sommerfelt, H. Stormorken, K. Dahlström, *Acta Radiologica.* suppl 362 (1980) 131.
- [24] T. Aakhus, K. Dahlström, D.D. Shaw, T. Leese, L. March, *Acta Radiol.* suppl 366 (1983) 20.
- [25] C.M. Erley, B.D. Bader, E.D. Berger, A. Vochazer, J.J. Jorzik, K. Dietz, T. Risler, *Crit Care Med.* 29 (8) (2001) 1544.
- [26] C. Houlihan, M. Jenkins, T. Osicka, A. Scott, D. Parkin, G. Jerums, *Aust Nz J Med.* 29 (1999) 693.
- [27] N. Chalmers, R.W. Jackson, *Br J Radiol.* 348 (1999) 491.
- [28] M.C. Heinrich, M.K. Kuhlmann, A. Grgic, M. Heckmann, B. Kramann, M. Uder, *Radiology*, 235 (2005) 843.
- [29] H.O. Stolberg, B.L. McClennan, *Curr Probl Diagn Radiol.* March/Apri (1991) 4.
- [30] T. Kitahashi, I. Furuta, *J Pharm Biomed Anal.* 34(1) (2004) 153.
- [31] A. Putschew, S. Schittko, M.J. Jekel, *Chromatogr A.* 930 (1-2) (2000) 127.
- [32] V.P. Shah, K.K. Midha, J.W. Findlay, H.M. Hill, J.D. Hulse, I.J. McGilveray, G. McKay, K.J. Miller, R.N. Patnaik, M.L. Powell, A. Tonelli, C.T. Viswanathan, A. Yacobi, *Pharm Res.* 17 (2000) 1551.
- [33] A.K. Chaudhary, E.R. Wickremsinhe, M.J. Berna, B.L. Ackermann, *Am Drug Discov.* 1(1) (2006) 34.



#### 2.4.2 Calculs des clairances

La clairance de l'iohexol a varié entre 62,5 et 291 mL/min chez les sujets ayant une fonction rénale normale et entre 23,3 et 70,5 mL/min pour les sujets avec une fonction rénale réduite (tableau IV). Pour ce qui est de l'iodixanol, les clairances ont variés entre 134 et 8795 mL/min chez les sujets dont la fonction rénale était normale et entre 40 et 1314 mL/min pour les sujets ayant une dysfonction rénale (tableau IV).

Tableau IV : Paramètres pharmacocinétiques et calculs de la clairance de l'iohexol et de l'iodixanol chez 17 sujets.

Sujets	Dose (μmol)		Concentration initiale plasmatique (μmol/L)				Volume apparent (Vapp β) (L)		poids (kg)	Vapp/poids (L/kg)		Constante de distribution (Ke α)		Constante d'élimination (Ke β)		Temps de demi-vie (t <sub>1/2</sub> ) (h)				Clairance (mL/min)	
	iohexol	iodixanol	iohexol		iodixanol		iohexol	iodixanol		iohexol	iodixanol	iohexol	iodixanol	iohexol		iodixanol		iohexol	iodixanol		
			α	β	α	β								α	β	α	β				
1	3940	25235	86,1	65,7	512,7	343,3	60,0	73,5	91,7	0,654	0,802	0,274	0,242	0,179	0,153	2,53	3,86	2,87	4,52	179,3	187,9
2	3940	12618	299,1	33,2	595,1	70,3	118,7	179,5	47,7	2,489	3,764	0,470	0,529	0,146	0,177	1,47	4,75	1,31	3,91	289,0	530,7
3	3940	12618	156,4	50,7	506,9	336,0	77,7	37,6	89,0	0,873	0,422	0,400	0,360	0,164	0,214	1,73	4,24	1,92	3,23	211,8	134,2
4	3940	24394	128,7	122,7	393,3	114,2	32,1	213,5	105,0	0,306	2,034	0,318	0,368	0,247	0,168	2,18	2,80	1,88	4,12	132,3	599,2
5	3940	9674	153,9	188,2	252,5	176,9	20,9	54,7	81,7	0,256	0,669	0,354	0,434	0,277	0,226	1,96	2,50	1,60	3,07	96,7	205,7
6	3940	60986	60,4	39,5	5559,0	50,4	99,8	1211,2	81,7	1,221	14,825	0,335	0,515	0,164	0,084	2,07	4,24	1,35	8,29	271,8	1687,6
7	3940	49630	44,4	21,0	5615,6	35,5	187,6	1400,0	56,8	3,303	24,648	0,184	0,610	0,093	0,023	3,76	7,45	1,14	29,5	291,0	548,1
8	3940	12618	139,3	358,8	125,6	443,7	11,0	28,4	81,0	0,136	0,351	0,277	0,341	0,342	0,425	2,51	2,03	2,03	1,63	62,5	201,3
9	3940	8412	93,3	99,3	24,3	3,20	39,7	2624,8	88,5	0,448	29,658	0,188	0,426	0,152	0,201	3,69	4,55	1,63	3,45	100,8	8795,2
10	3940	52153	83,3	91,9	238,2	103,5	42,9	503,7	72,6	0,591	6,938	0,124	0,471	0,169	0,049	5,57	4,11	1,47	14,3	120,6	407,9
11	3940	23132	142,0	143,8	253,5	269,3	27,4	85,9	81,7	0,335	1,051	0,212	0,197	0,155	0,148	3,27	4,48	3,52	4,68	70,5	212,0
12	3940	29441	255,4	399,4	667,0	474,4	9,87	62,1	56,8	0,174	1,093	0,248	0,255	0,250	0,166	2,79	2,77	2,72	4,18	41,2	171,5
13	3940	14700	199,4	139,6	250,5	127,1	28,2	115,7	64,5	0,438	1,793	0,330	0,402	0,146	0,136	2,10	4,74	1,72	5,08	68,8	262,8
14	3940	56780	55,6	75,2	244,3	236,5	52,4	240,1	59,0	0,888	4,069	0,102	0,192	0,027	0,010	6,81	25,9	3,61	68,4	23,3	40,5
15	3940	17665	155,6	125,1	112,9	74,9	31,5	236,0	52,7	0,598	4,478	0,0924	0,107	0,068	0,052	7,50	10,1	6,47	13,4	35,9	202,9
16	3940	25446	227,3	205,4	132,7	97,4	19,2	261,3	38,0	0,505	6,878	0,197	0,151	0,098	0,082	3,52	7,05	4,59	8,50	31,4	355,1
17	3940	7571	142,0	177,6	24,0	8,62	22,2	877,9	57,2	0,388	15,347	0,152	0,364	0,155	0,090	4,55	4,48	1,90	7,72	57,1	1314,1

Les sujets 1 à 10 avaient une fonction rénale normale alors que les sujets 11 à 17 avaient plutôt une fonction rénale réduite.

## 2.5 Performance des marqueurs de filtration glomérulaire

Afin de répondre à l'objectif 2 C) qui était d'évaluer comment se comportaient les autres marqueurs conventionnels de FG et celui de la clairance d'iodixanol comparés à l'étalon d'or « clairance d'iohexol », des corrélations entre la clairance d'iohexol et les autres marqueurs de FG (ClCys C, ClCrC MDRD et ClCr Cockcroft et Gault) et la clairance d'iodixanol ont été explorées pour l'ensemble des sujets (tableau V; figures 24 à 35, annexe J).

Ces analyses montrent que la clairance d'iodixanol n'est associée à aucun autre des marqueurs de la FG avec des corrélations toutes inférieures à 0,399 (tableau V), et en ordre croissant, on retrouve la clairance de la créatinine calculée par l'équation de Cockcroft et Gault, la clairance de la cystatine C et la clairance de la créatinine par l'équation MDRD (tableau V). Par ailleurs, même le marqueur de FG conventionnel, soit la clairance de la créatinine par MDRD, montre ses limites. En effet, la corrélation entre la clairance de la créatinine et la celle de l'iohexol n'est que de 0,714 ( $p = 0,001$ ).

Tableau V: Corrélations entre les différents marqueurs de filtration glomérulaire chez 17 sujets.

Corrélations r Pearson (binormalité)		Clairance iohexol	Clairance cystatine C	Clairance créatinine par Cockcroft et Gault	Clairance créatinine par MDRD	Clairance iodixanol
Clairance iohexol	r Pearson	1,000	0,671	0,518	0,714	0,399
	$r^2$	1,000	0,449	0,269	0,509	0,159
	p	-	0,003	0,0330	0,001	0,919
Clairance cystatine C	r Pearson	0,671	1,000	0,559	0,759	-0,052
	p	0,003	-	0,020	0,0004	0,844
Clairance créatinine par Cockcroft et Gault	r Pearson	0,518	0,559	1,000	0,842	0,119
	p	0,0331	0,0197	-	0,00002	0,649
Clairance créatinine par MDRD	r Pearson	0,714	0,759	0,842	1,000	0,041
	p	0,001	0,0004	0,00002	-	0,875
Clairance iodixanol	r Pearson	0,027	-0,052	0,119	0,041	1,000
	p	0,919	0,844	0,649	0,875	-

La corrélation entre les différents marqueurs de FG pour chacun des groupes est présentée à l'annexe K.

### 3. APPLICATIONS CLINIQUES

#### 3.1 Pharmacocinétique

Une transformation logarithmique des figures 6 et 7 du manuscrit de l'article a permis de calculer les paramètres pharmacocinétiques permettant de calculer la clairance de l'iohexol et celle de l'iodixanol chez les 17 sujets, soient le  $V_{app}$  et le  $K_{e\beta}$ . Les paramètres  $K_{d\alpha}$  et  $t_{1/2}$  pour les deux phases ont également été calculés (tableau IV). Un exemple des calculs pharmacocinétique est présenté à l'annexe M.

Comme le volume administré d'iohexol était toujours constant (5 mL), la dose de l'iohexol était la même pour tous les sujets, soit de 3 940  $\mu$ moles. La dose de l'iodixanol était, par contre, souvent variable entre les sujets car le volume administré d'iodixanol avait été laissé à la discrétion de l'angioradiologiste. Elle a varié de 7 571 à 60 986  $\mu$ moles (tableau IV).

Tel que mentionné dans la section précédente, la phase d'élimination était caractérisée par les mesures post-8 à 24 heures. De ce fait, une régression linéaire a été appliquée sur la transformation logarithmique de ces mesures afin de pouvoir chiffrer le  $V_{app}$  de l'iohexol et de l'iodixanol.

Le  $V_{app}$  se situait de 11,0 à 188 L pour la molécule iohexol et de 37,6 à 2625 L pour la molécule iodixanol pour le groupe de sujet avec une fonction rénale normale (tableau IV). Alors que le  $V_{app}$  du groupe avec une fonction rénale diminuée variait plutôt de 9,87 à 52,4 L pour l'iohexol et de 62,1 à 878 L pour l'iodixanol. Si le  $V_{app}$  était exprimé en L/kg du sujet, il était possible de constater que les sujets du groupe ayant une dysfonction rénale avaient un  $V_{app}$  plus faible en général pour la molécule iohexol que celui observé chez ceux ayant une fonction rénale normale. Ce phénomène était inverse pour la molécule iodixanol, c'est-à-dire que le  $V_{app}$  était beaucoup plus grand chez les sujets ayant une fonction rénale diminuée.

L'observation des constantes de la phase de distribution des molécules iohexol et iodixanol a montré qu'elles étaient environ de 2 à 3 fois plus élevées comparativement à celles de la phase d'élimination. Selon la littérature présentée dans la section 6.3 du deuxième chapitre lorsque  $K_{d\alpha}$  est  $\gg K_{e\beta}$ , le temps de distribution des molécules devient alors négligeable par rapport à celui de l'élimination. Par conséquent, les calculs de clairance de l'iohexol et de l'iodixanol ont été uniquement faits à partir des paramètres pharmacocinétiques de la phase d'élimination de la molécule, soient les mesures post-8 à 24 heures. Ainsi, le calcul de la clairance plasmatique rénale des molécules iohexol et iodixanol a été simplifié par l'équation suivante :  $Cl = K_{e\beta} V_{app}$  (voir section 6.3.4 du deuxième chapitre).

### 3.2 Marqueur de filtration glomérulaire

La clairance de l'iohexol a été un marqueur de FG discriminant de la fonction rénale pour l'ensemble des sujets. En effet, les valeurs des clairances de l'iohexol pour le groupe ayant une fonction rénale normale étaient supérieures ou égales à 60 mL/min et inférieures à 60 mL/min pour le groupe ayant une dysfonction rénale (tableau VI). Toutefois, les sujets 11 et 13 du groupe avec une fonction rénale réduite avaient une clairance d'iohexol supérieure à 60 mL/min. Il ne faut pas oublier que ces sujets avaient été associés à ce groupe car leur calcul de  $ClCr$  pré-intervention par l'équation de

Cockcroft et Gault avait démontré des clairances de 58,1 et 55,9 mL/min respectivement (très près du seuil de 60 mL/min). La mesure 4 heures post-intervention de la ClCr par le calcul de l'équation de Cockcroft et Gault a cependant révélé des TFG supérieurs à 60 mL/min; soient de 60,1 mL/min pour le sujet 11 et de 64,0 mL/min pour le sujet 13. Ainsi, la clairance d'iohexol de ces sujets allait dans le même sens que la mesure de la ClCr post-4 heures.

Concernant le marqueur de la clairance d'iodixanol, les deux groupes n'affichent pas de grandes variations entre leurs valeurs comparativement à celles démontrées par la clairance de l'iohexol (tableau VI).

Pour les autres marqueurs de FG (tableau VI), la ClCys C et la ClCr via l'équation de MDRD sont deux marqueurs qui ne semblent pas aller dans le même sens que ceux de la clairance d'iohexol pour les sujets ayant des caractéristiques anthropométriques dans les extrémités (exemple : sujet 16 et 17). Prenons l'exemple du sujet 16, ses données anthropométriques étaient les suivantes : femme âgée de 78 ans mesurant 1,27 m et pesant 38,0 kg. Les valeurs de ClCys C et ClCr MDRD post-4 heures montrent une fonction rénale normale (74,9 et de 61,3 mL/min respectivement) alors que celles calculées par la ClCr via Cockcroft et Gault et la clairance de l'iohexol révèlent plutôt une atteinte rénale (TFG étaient de 30,2 mL/min pour la ClCr via Cockcroft et Gault, et de 31,4 mL/min pour celle de l'iohexol).



Tableau VI : Comparaison des valeurs de clairance de créatinine, de cystatine C, d'iohexol et d'iodixanol à différents temps chez 17 sujets.

Sujets	Sexe (H/F)	Âge (années)	Poids (kg)	Taille (m)	Clairance créatinine pré-angio calculée * (mL/min)	Clairance cystatine C post-4h (mL/min)	Clairance créatinine post-4h par MDRD (mL/min par 1,73 m <sup>2</sup> )	Clairance créatinine post-4h calculée * (mL/min)	Clairance Iohexol (mL/min)	Clairance Iodixanol (mL/min)
1	H	63	91,7	1,58	76,1	109	63,0	81,0	179	188
2	F	62	47,7	1,67	87,8	371	154	101	289	531
3	H	59	89,0	1,76	173	912	164	188	212	134
4	F	52	105	1,27	214	115	135	218	132	599
5	H	69	81,7	1,83	96,7	120	105	105	96,7	206
6	H	65	81,7	1,67	85,1	207	86,9	93,4	272	1688
7	F	54	56,8	1,73	113	648	137	118	291	548
8	H	69	81,0	1,73	97,1	222	101	101	62,5	201
9	H	62	88,5	1,86	89,9	155	95,8	114	101	8795
10	H	56	72,6	1,55	106	104	115	116	121	408
11	H	70	81,7	1,70	58,1	75,2	55,7	60,1	70,5	212
12	F	70	56,8	1,39	50,2	57,9	61,8	50,3	41,2	172
13	F	69	64,5	1,61	55,9	63,4	69,6	64,0	68,8	263
14	F	74	59,0	1,61	33,9	58,3	49,4	41,0	23,3	40,5
15	F	78	52,7	1,58	25,1	52,2	42,5	30,5	35,9	203
16	F	78	38,0	1,27	24,1	74,9	61,3	30,2	31,4	355
17	H	71	57,2	1,73	43,3	114	65,6	47,9	57,1	1314

\* La clairance de créatinine plasmatique pré-intervention et 4 heures post-intervention ont été calculées par l'équation de Cockcroft et Gault.

Les sujets 1 à 10 avaient une fonction rénale normale alors que les sujets 11 à 17 avaient plutôt une fonction rénale réduite.



## **CINQUIÈME CHAPITRE**

### **DISCUSSION**

Les travaux réalisés durant cette maîtrise avaient pour but de mettre au point une méthode analytique pour permettre la mesure des concentrations d'iohexol et la clairance d'iohexol chez des sujets subissant une angiographie sans modifier les procédures cliniques et en tenant compte de l'administration d'une autre SC, l'iodixanol pour l'imagerie.

Nos résultats montrent qu'en effet nous avons maintenant une nouvelle méthodologie analytique disponible capable de séparer et quantifier l'iohexol et l'iodixanol et que cette méthode peut être utilisée cliniquement.

#### **1. MÉTHODES DE SÉPARATION ANALYTIQUE**

Afin de répondre à la question de recherche : est-il faisable de mesurer la filtration glomérulaire par la mesure de la clairance d'iohexol chez des sujets qui recevraient une combinaison iohexol-iodixanol lors d'une intervention d'angiographie ? Un protocole de recherche scientifique a été élaboré pour séparer et quantifier l'iohexol et l'iodixanol dans le plasma par un électrophorèse capillaire. La possibilité d'une certaine complexation des ions du tampon borate et la migration plus

lente que le flux électro-osmotique laissaient présager, par la présence d'une charge globale négative sur les molécules, la possibilité de les séparer. La variation des conditions analytiques n'a pas conduit à une méthode de séparation adéquate et suffisamment robuste pour être appliquée à des fins de quantification.

De ce fait, un nouveau protocole de séparation et de quantification des molécules iohexol et iodixanol a été mis sur pied pour l'utilisation du HPLC-MSD Tof. Les molécules iohexol et iodixanol ont été séparées et quantifiées dans les échantillons de standards, de contrôles et des sujets. La méthode analytique a été soumise à une validation selon les critères de la FDA afin de s'assurer de la justesse des résultats des analyses effectués par HPLC-MSD Tof. Ainsi, les critères de sélectivité, de spécificité, de précision, de recouvrement et de stabilité à court et à long terme ont été évalués; puis, ils se sont avérés conformes aux critères établis par la FDA. C'est pourquoi la méthode par HPLC-MSD Tof peut être considérée tout à fait adéquate et nous avons donc répondu à l'objectif 1 de l'étude.

## 2. QUANTIFICATION DE L'IOHEXOL ET DE L'IODIXANOL DANS LE PLASMA

Les objectifs 2A) et 2B) de l'étude, qui consistaient à mesurer la clairance de l'iohexol et à explorer la clairance de l'iodixanol, ont été atteints à l'aide des profils cinétiques des molécules iohexol et iodixanol évalués chez dix-sept sujets ayant subi une angiographie abdominale ou des membres inférieurs avec ou sans angioplastie.

Avec la mesure 4 heures post-intervention, il était déjà possible de discriminer la fonction rénale des deux groupes de sujets par les valeurs des concentrations d'iohexol car les valeurs des clairances de l'iohexol pour le groupe ayant une fonction rénale normale étaient supérieures ou égale à 60 mL/min et inférieures à 60 mL/min pour le groupe ayant une dysfonction rénale. De plus, les mesures d'iohexol post-4, 8 et 24 heures ont démontré que la molécule s'éliminait plus rapidement que celle de l'iodixanol. Ainsi, il est possible de confirmer que la rapidité de l'élimination des molécules iohexol et iodixanol de l'organisme varient avec la dose administrée (Nossen *et al.*, 1995). Toutefois, certains auteurs ont évoqué l'hypothèse que la durée des SC dans l'organisme pourrait être une des causes du développement de la NESC (Berg et Jacobsen, 1989; Hietala et Almén, 1989; Mudge, 1981). Les valeurs des concentrations d'iohexol post-24 heures étaient environ 10 fois plus élevées dans le groupe ayant une dysfonction rénale que celles dans le groupe ayant une fonction rénale normale. Ainsi, il a été observé comme d'autres l'ont fait que les sujets avec une fonction rénale réduite éliminent moins bien l'iohexol (Chalmers et Jackson, 1999; Lee *et al.*, 2006; Schröder, 2005).

Les concentrations de la molécule iodixanol n'ont pas permis de discriminer aussi bien la fonction rénale des deux groupes de sujets pour plusieurs raisons. Premièrement, la dose d'iodixanol administrée n'était pas la même pour tous les sujets. Deuxièmement, le mode d'administration de la dose de l'iodixanol n'a pas été exécuté de la même façon que celui de l'iohexol. La dose d'iohexol a été donnée sous forme de bolus pour chacun des sujets alors que celle de l'iodixanol a été donnée en

volume fractionné différent durant toute l'intervention afin de maintenir l'opacification des veines, des artères et même de certains organes. Évidemment, le mode d'administration de la dose d'iodixanol a également varié selon la rapidité de la propagation de la SC d'un sujet à l'autre. Troisièmement, comme la molécule iodixanol est considérée comme le meilleur choix des SC pour ses propriétés moins néphrotoxiques (Aspelin *et al.*, 2003; Chalmers et Jackson, 1999; McCullough *et al.*, 2006; Nossen *et al.*, 1995), il est alors envisageable d'évoquer la possibilité que l'élimination de la molécule d'iodixanol ne dépend pas de l'intégrité de la fonction rénale. Cependant, cette hypothèse semble plutôt improbable.

Les calculs de clairance des molécules iohexol et iodixanol ont été effectués selon le même modèle pharmacocinétique, soit celui de deux compartiments. Puisque la phase de distribution des molécules était très rapide dans les deux cas, les calculs de clairance de l'iohexol et de l'iodixanol ont été réalisés uniquement par la phase d'élimination. Les résultats des clairances d'iohexol dans les deux groupes de sujets participants ont démontré que la clairance d'iohexol est un bon marqueur de FG. Ainsi, le pouvoir discriminant du marqueur de la clairance d'iohexol concernant les divers niveaux de la fonction rénale a été confirmé. Alors que pour l'instant, les résultats des clairances d'iodixanol ne permettent pas d'invoquer que la clairance de cette molécule pourrait être un bon reflet de la fonction rénale. Idéalement, les calculs de clairance d'iodixanol devraient être repris afin de tenir compte des divers modes d'administration de la dose pour chacun des sujets ce qui dépasse évidemment les objectifs de l'actuelle étude.

### 3. CORRÉLATIONS ENTRE LES DIFFÉRENTS MARQUEURS DE FILTRATION GLOMÉRULAIRE

Bien que de routine on puisse se satisfaire de marqueurs de FG influencés par d'autres facteurs que la FG, il faudrait idéalement un marqueur pour mieux prédire le risque de NESC et mieux évaluer l'efficacité des stratégies préventives réduisant l'incidence de NESC (hydratation, NAC).

L'interprétation des corrélations entre les différents marqueurs de FG conventionnels, la clairance d'iodixanol et l'étalon d'or « la clairance d'iohexol » a permis de déterminer que tous les marqueurs sauf celui de la clairance d'iodixanol sont corrélés de façon significative avec celui de la clairance d'iohexol. Cependant, la ClCr calculée par l'équation MDRD et la ClCys C restent des marqueurs endogènes de FG imparfaits, car ils ne tiennent pas compte des données anthropométriques des données individuelles. En effet, chez des sujets ayant une fonction rénale réduite et des données anthropométriques extrêmes, la ClCr calculée par l'équation MDRD et la ClCys C ne permettraient pas de bien discriminer leur fonction rénale. Il a été démontré qu'il est préférable d'utiliser un marqueur exogène afin de ne pas rendre de faux diagnostic concernant la fonction rénale. En effet, un marqueur exogène éliminé simplement par filtration glomérulaire sans sécrétion ni réabsorption n'est pas influencé par le métabolisme de la personne alors qu'un marqueur endogène reste tributaire du métabolisme (Erley, 2001; Frennby et Sterner, 2002; Nilsson-Ehle et Grubb, 1994). Ainsi, les marqueurs de pCr, de ClCr par l'une ou l'autre des équations

mentionnées dans ce mémoire et celui de la ClCys C restent pas moins des marqueurs non idéaux pour la mesure du TFG.

Donc, nos résultats pourraient réhabiliter l'usage de l'iohexol comme marqueur de FG soit pour dépister les sujets à risque ou encore évaluer l'impact de l'administration de la NAC. Des études supplémentaires devraient donc être conduites pour évaluer cette hypothèse et ainsi possiblement optimiser la prise en charge de la NESC.

#### 4. FORCES, LIMITES ET BIAIS

Cette étude comprend plusieurs forces mais elle n'est malheureusement pas exempte de certaines limites. La première force de l'étude réside dans sa faisabilité en clinique. L'étude a été réalisée dans un contexte qui tient compte de la réalité clinique, c'est-à-dire les soins ambulatoires, les procédures d'interventions en imagerie médicale et la substance de contraste utilisée en angiographie « iodixanol ». De plus, une autre des forces de l'étude tient de la méthodologie de mesure de l'iohexol plasmatique lors d'une co-administration iohexol-iodixanol qui est tout à fait novatrice. L'étude a d'ailleurs démontré qu'une seule mesure de l'iohexol à post-4 heures pourrait probablement être suffisante pour déterminer le niveau d'atteinte rénale post-intervention, ce qui s'avère fort prometteur pour une application clinique très faisable. Également, il y a eu démonstration de l'intéressant potentiel clinique de

l'instrument de mesure HPLC-MSD Tof dans un contexte d'analyse de routine en milieu hospitalier.

Toutefois, il n'est pas possible avec cette étude d'affirmer qu'une mesure d'iodixanol post-intervention pourrait déterminer la fonction rénale d'un sujet car le mode d'administration de l'iodixanol a été fait différemment à celui de l'iohexol.

Concernant la validité interne de l'étude, un biais d'information possible relié au biais d'instrumentation a été identifié. Les analyses des échantillons effectuées par l'instrument HPLC-MSD Tof pouvaient en effet donner des résultats variables pour un même échantillon. Par contre, la reproductibilité des analyses de l'instrument était vérifiée pour chaque jour d'analyse par 3 échantillons contrôles, puis corrigée par calibration au besoin. On ne pouvait donc pas prédire l'erreur de mesure associée mais il était possible de la contrôler. Cependant, cette imprécision n'a pas été assez importante pour générer un biais de classification.

Pour ce qui est du biais de sélection, il faut l'envisager dans cette étude étant donné qu'elle a été effectuée auprès de volontaires. Malgré le volontariat des sujets à participer à l'étude, il était impossible que les sujets aient une influence directe sur les mesures des TFG car ils ne pouvaient évidemment pas contrôler leur fonction rénale. De plus, la connaissance de l'état de leur fonction rénale ou de leur intervention ne pouvaient pas non plus influencer la mesure des TFG des sujets pour générer un biais d'information.

Un biais de mauvaise classification ne peut être écarté étant donné que les sujets ont été classés selon l'intégrité de leur fonction rénale, à partir d'une mesure qui a été jugée imparfaite. Cela s'applique particulièrement aux sujets ayant des paramètres anthropométriques extrêmes, comme nous en avons discuté précédemment. Il faut donc rester prudent à l'égard des résultats obtenus pour ces sujets. Malgré tout, cette mauvaise classification potentielle ne semble pas avoir d'impact sur le sens de nos conclusions.

Alors que pour ce qui est de la validité externe de l'étude, elle est limitée pour l'instant, étant donné son caractère exploratoire. Elle a donc généré beaucoup d'information concernant l'instrument de mesure, qui est habituellement plus utilisé dans un contexte de recherche que celui de routine en clinique, mais a montré tout son potentiel et a amélioré les connaissances sur la co-administration des SC.

## 5. PERSPECTIVES CLINIQUES

Cette étude a permis de démontrer que la clairance d'iohexol est un bon marqueur de FG même si on co-administre l'iohexol (en faible quantité) avec l'iodixanol. Il est également possible de suivre cinétiquement l'iohexol lors d'intervention d'imagerie médicale par de simples prélèvements sanguins. En fait une seule mesure prise entre 4 et 24 heures après l'administration d'iohexol semble suffisante pour prédire la persistance de l'iohexol en circulation et donc une insuffisance rénale existante indépendamment de facteurs tel l'âge, le poids et la



créatinine. Concrètement le médecin traitant pourrait préalablement dépister (phénotyper) le sujet à risque de NESC en mesurant la concentration résiduelle d'iohexol 4 ou 24 heures après l'administration de 5 mL d'iohexol, et prendre des stratégies préventives pour une imagerie subséquente.

Également autre possibilité, comme la méthodologie analytique permet d'obtenir un résultat en moins d'une heure, à condition que l'instrument HPLC-MSD Tof soit disponible sur place, on pourrait alors détecter rapidement les sujets chez qui la persistance d'une concentration élevée d'iohexol 4 heures après l'imagerie suggère un risque plus élevé de NESC et donc appliquer un suivi approprié.

## SIXIÈME CHAPITRE

### CONCLUSION

Cette étude a permis le développement d'un protocole scientifique pour l'utilisation de la HPLC-MSD Tof afin de séparer et de quantifier les molécules iohexol et iodixanol co-administrées dans le plasma. Le protocole élaboré est simple et il tient compte de la réalité clinique. Des mesures des taux plasmatiques de ces molécules ont permis de déterminer par des calculs pharmacocinétiques que la clairance de l'iohexol discriminait bien la fonction rénale normale de la fonction altérée. De plus, les corrélations entre les valeurs de la clairance de l'iohexol et les autres marqueurs conventionnels de FG et celui de la clairance d'iodixanol ont illustré que la clairance de la créatinine calculée soit par l'équation MDRD ou par Cockcroft et Gault et la clairance de la cystatine C corrèlaient de manière significative avec l'étalon d'or, soit la clairance de l'iohexol. Toutefois, ces marqueurs conventionnels restent des mesures imparfaites du TFG car se sont des marqueurs endogènes qui varient selon le métabolisme des individus et que malgré des corrections à l'aide d'équations mathématiques, il est difficile de bien discriminer la fonction rénale des personnes ayant des valeurs de clairance extrêmes.

Par conséquent, il pourrait être possible de se fier à la mesure de la clairance de l'iohexol comme meilleur marqueur du TFG afin de prévenir, de diagnostiquer et de

traiter la NESC chez ses sujets. Les méthodes élaborées dans le cadre de cette étude pourront de plus être mises à profit dans la recherche fondamentale et les essais cliniques. Un protocole scientifique de séparation et quantification des molécules des SC iohexol et iodixanol simple, fiable et robuste pour déterminer leur clairance comme marqueur de la fonction rénale est maintenant disponible et pourra alors simplifier la tâche dans plusieurs contextes.

## REMERCIEMENTS

Ce projet de recherche n'aurait jamais eu lieu sans l'aide financière de la Fondation de l'Hôpital Charles LeMoine ni sans la bourse d'étude qu'elle m'a accordée et je la remercie sincèrement !

Grâce à ce mémoire, j'ai su démontrer qu'il est possible d'appliquer les sciences fondamentales aux sciences cliniques en établissant des collaborations universitaires. En effet, ce projet de recherche, reliant les sciences cliniques et les sciences fondamentales, doit sa grande réussite grâce aux nombreuses collaborations obtenues dans trois universités et un centre hospitalier. De ce fait, je remercie les membres de l'équipe de recherche du centre régional de la spectrométrie de masse de l'Université de Montréal, qui m'ont chaleureusement accepté dans leur labo comme l'une de leurs étudiantes, pour m'avoir fourni tous les outils nécessaires à la réussite de ce projet. En outre, je remercie spécialement Mme Alexandra Furtos pour son support scientifique, pour sa disponibilité sans borne et son infime gentillesse. Sans elle, ce mémoire n'existerait pas ! Je remercie également Mme Karine Venne non seulement pour ses précieux conseils scientifiques mais aussi pour sa joie de vivre contagieuse qui a ensoleillé mes journées ! C'est avec une immense gratitude que je remercie la direction de la faculté de chimie et de pharmacologie pour m'avoir permis de suivre aux études supérieures des cours sur la spectrométrie de masse et la

pharmacologie afin que j'acquière toutes les connaissances nécessaires pour la réalisation de ce projet ! Je dois souligner, l'aide précieuse de l'Université du Québec à Montréal, où j'ai complété mes études graduées en biochimie, pour m'avoir permis d'utiliser l'électrophorèse capillaire et pour m'avoir mis en contact avec Mme Alexandra Furtos. De plus, je tiens à remercier la direction des Programmes de sciences cliniques de la Faculté de médecine et des sciences de la santé de l'Université de Sherbrooke de m'avoir permis de réaliser un projet de recherche à la fois clinique et fondamental.

À l'hôpital Charles LeMoine, je remercie spécialement, Dr Daniel Lesiège, biochimiste médical, pour son généreux soutien en biochimie et sa disponibilité. Je remercie tout particulièrement les angioradiologistes : Dr Martin Francoeur, Dre Sylvie Groleau et Dr Maxime Tremblay pour leurs merveilleuses collaborations, leurs conseils et leurs encouragements. J'adresse aussi un grand mot de remerciement et d'encouragement aux membres des équipes des soins ambulatoires, de l'imagerie médicale et du centre de recherche. Je remercie également Mme Mylène Beaulieu pour son dévouement et son aide fort appréciée durant les étés. Finalement, je ne peux passer sous silence mes directeurs de recherche, Dr Jean Cusson et Dre Maryse Guay, pour m'avoir donné la chance de travailler sur un aussi beau projet de recherche. Je ne les remercierai jamais assez pour la confiance et la liberté qu'ils m'ont accordées et pour leurs nombreux encouragements dans les moments difficiles.

Pour terminer, je remercie mes parents et ma soeur de m'avoir toujours soutenue durant mes études. Sans vous, je n'aurais jamais passé à travers ces deux dernières années. Enfin, je remercie Jean-Nicolas qui a toujours cru en moi et m'a toujours encouragée à aller plus loin. Son amour et sa confiance en moi m'ont donné les forces nécessaires pour aller jusqu'au bout !

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Aakhus, T., Sommerfelt, C., Stormorken, H., Dahlström, K. (1980). Tolerance and excretion of iohexol after intravenous injection in healthy volunteers. *Acta Radiologica, suppl 362*, 131-133.

Aakhus, T., Dahlström, K., Shaw, D.D., Leese, T., March, L. (1983). Human pharmacologic trials with iohexol. *Acta Radiologica, suppl 366*, 20-22.

Abizai, A., Chester, E.C., Mintz, G.S., Dosa, S., Popma, J., Pichard, A.D., Satler, L.F., Harvey, M., Kent, K.M., Leon, M.B. (1999). Effects of dopamine and aminophylline on contrast-induced acute renal failure after coronary angioplasty in patients with preexisting renal insufficiency. *The American Journal of Cardiology*, 83, 260-263.

Abrahamson, M., Olsson, I., Palsdottir, A., Ulvsbäck, M., Lundwall, Å., Jensson, O., Grubb, A. (1990). Structure and expression of the human cystatin C gene. *Biochemistry Journal*, 268, 287-294.

Aiach, J.-M., Besner, J.-G., Buri, P., LeBlanc, P.-P., Lesne, M. (1985). *Traité de biopharmacie et pharmacocinétique*. Montréal : Les Presses de l'Université de Montréal.

Albrechtsson, U., Larusdottir, H., Norgren, L., Lundby, B. (1992). Iodixanol- A New Nonionic Dimer- in Aortofemoral Angiography. *Acta Radiologica*, 33, 611-613.

Almén, T. (1994). The Etiology of Contrast Medium Reactions. *Investigative Radiology*, 29 (1), s37-s45.

Alonso, A., Lau, J., Jaber, B.L., Weintraub, A., Sarnal, M.J. (2004). Prevention of radiocontrast nephropathy with n-acetylcysteine in patients with chronic kidney disease: a meta-analysis of randomized, controlled trials. *American Journal Kidney Diseases*, 43 (1), 1-9.

Andrew, E., Berg, K.J. (2004). Nephrotoxic effects of x-ray contrast media. *Journal of Toxicology*, 42 (3), 325-332.

Asif, A., Preston, R.A., Roth, D. (2003). Radiocontrast-induced nephropathy. *American Journal of Therapeutics*, 10, 137-147.

Aspelin, P., Aubry, P., Fransson, S.-G., Strasser, R., Willenbrock, R., Berg, K.-J. (2003). Nephrotoxic effects in high-risk patients undergoing angiography. *The New England Journal of Medicine*, 348 (6), 491-499.

Association Médicale Mondiale (octobre 2000). *Déclaration d'Helsinki*. Document téléaccessible à l'adresse <[http://www.wma.net/f/policy/17-c\\_f.html](http://www.wma.net/f/policy/17-c_f.html)> Consulté le 16 février 2005 et le 10 avril 2006.

Bäck, S.-E., Ljungberg, B., Nielsson-Ehle, I., Borgä, O., Nielsson-Ehle, P. (1989). Age dependance of renal function: clearance of iohexol and p-amino hippurate in healthy males. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 49, 641-646.

Bader, B.D., Berger, E.D., Heede, M.B., Silberbaur, I., Duda, S., Risler, T., Erley, C.M. (2004). What is the best hydration regimen to prevent contrast media-induced nephrotoxicity? *Clinical Nephrology*, 62, 1-7.

Bakris, G.L., Lass, N., Gaber, O. (1990). Radiocontrast medium-induced decline in renal function: a role for oxygen free radicals. *American Journal of Physiology*, 258, F115-F120.

Barrett, B.J., Parfrey, P.S. (1994). Prevention of nephrotoxicity induced by radiocontrast agents. *The New England Journal of Medicine*, 331 (21), 1449-1450.

Barr, W.H. (1968). Principles of biopharmaceutics. *American Journal of Pharmaceutical Education*, 52, 958-981.

Bartley, O., Bengtsson, U., Cederbom, G. (1969). Renal function before and after urography and angiography with large doses of contrast media. *Acta Radiological Diagnosis*, 8 (1), 9-16.

Berg, K.J., Jacobsen, J.A. (1989). Patient Safety and adverse events in contrast medium examinations. *International Congress Series 816*. Amsterdam, Excerpta Medica.

Billinger, M., Hess, O.M., Meier, B. (2004). Prevention of contrast-induced renal dysfunction by N-acetylcysteine. *European Heart Journal*, 25, 188-189.

Blass, K.G., Thibert, R., Lam, L.K. (1974). A study of the mechanism of the jaffé reaction. *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*, 12, 336-356.

Blirup-Jensen, S. (2001). Protein standardization III: Method optimization basic principles for quantitative determination of human serum proteins on automated instruments based on turbidimetry or nephelometry. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 39 (11), 1098-1109.



Boccalandro, F., Amhad, M., Smalling, R.W., Sdringola, S. (2003). Oral acetylcysteine does not protect renal function from moderate to high doses of intravenous radiographic contrast. *Catheterization and Cardiovascular Interventions*, 58, 336-341.

Bode, W., Engh, R., Musil, D., Thiele, U., Huber, R., Karshikov, A., Brzin, J., Kos, J., Turk, V. (1988). The 2.0 Å x-ray crystal structure of chicken egg white cystatin and its possible mode of interaction with cysteine proteinases. *The EMBO Journal*, 7, 2593-2599.

Bökenkamp, A., Domanetzki, M., Zinch, R., Schumann, G., Byrd, D., Brodehl, J. (1998). Cystatin C-new marker of glomerular filtration rate in children independent of age and height. *Pediatrics*, 101, 875-881.

Brezis, M., Seymour, R. (1995). Mechanisms of Disease: Hypoxia of the Renal Medulla- Its implications for disease. *The New England Journal of Medicine*, 332 (10), 647-655.

Briguori, C., Colombo, A., Violante, A., Balestrieri, P., Manganelli, F., Paolo, E.P., Golia, B., Lepore, S., Riviezzo, G., Scarpato, P., Focaccio, A., Lidrera, M., Bonizzoni, E., Ricciardelli, B. (2004). Standard vs double dose of N-acetylcysteine to prevent contrast agent associated nephrotoxicity. *European Heart Journal*, 25, 206-211.

Briguori, C., Manganelli, F., Scarpato, P., Elia, P.P., Golia, B., Riviezzo, G., Lepore, S., Librera, M., Villari, B., Colombo, A., Ricciardelli, B. (2002). Acetylcysteine and contrast agent-associated nephrotoxicity. *Journal of the American College of Cardiology*, 40 (2), 298-303.

Brown, S.C.W., O'Reilly, P.H. (1991). Iohexol clearance for the determination of glomerular filtration rate in clinical practice: evidence for a new gold standard. *The Journal of Urology*, 146, 675-679.

Chalmers, N., Jackson, R.W. (1999). Comparison of iodixanol and iohexol in renal impairment. *The British Journal of Radiology*, 348, 491-499.

Chaudhary, A.K., Wickremsinhe, E.R., Berna, M.J., Ackermann, B.L. (2006). A risk-based approach to bioanalytical methods validations and sample analyses during drug discovery and development. *American Drug discovery*, 1(1), 34-42.

Cockcroft, D.W., Gault, M.H. (1976). Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron*, 16, 31-41.

Cotgreave, I., Moldeus, P., Schuppe, I. (1991). The metabolism of N-acetylcysteine by human endothelial cells. *Biochemical Pharmacology*, 42 (1), 13-16.

Cornish, T.J., Cotter, R.J. (1997). High-order kinetic energy focusing in an end cap reflectron time-of-flight mass spectrometer. *Analytical Chemistry*, 69 (22), 4615-4618.

Cox, C.D., Tsikouris, J.P. (2004). Preventing contrast nephropathy: what is the best strategy? A review of the literature. *The Journal Clinical Pharmacology*, 44, 327-337.

Dawson, P. (1985). Contrast agent nephrotoxicity. An appraisal. *The British Journal of Radiology*, 58, 121-124.

Dawson, P., Howell, M. (1986). The non-ionic dimers: a new class of contrast agents. *The British Journal of Radiology*, 59 (706), 987-991.

Delanaye, P., Lambermont, B., Chapelle, J-P., Gielen, J., Gerard, P., Rorive, G. (2004). Plasmatic cystatin C for the estimation of glomerular filtration rate in intensive care units. *Intensive Care Med*, 30, 980-983.

Detrenis, S., Meschi, M., Musini, S., Savazzi, G. (2005). Lights and shadows on the pathogenesis of contrast-induced nephropathy: state of the art. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 20, 1542-1550.

Dharnidharka, V.R., Kwon, C., Stevens, G. (2002). Serum cystatin C is superior to serum creatinine as a marker of kidney function: a meta-analysis. *American Journal Kidney Disease*, 40, 221-226.

Diaz-Sandoval, L.J., Kosowsky, B.D., Losordo, D.W. (2002). Acetylcysteine to prevent angiography-related renal tissue injury. *American Journal Cardiology*, 89 (3), 356-358.

Doucet, H. (2002). *L'éthique de la recherche*. Guide pour le chercheur en sciences de la santé. Montréal : Les Presses de l'Université de Montréal.

Durham, J.D., Caputo, C., Dokko, J., Zaharakis, T., Pahlavan, M., Keltz, J., Dutka, P., Marzo, K., Maesaka, J.K., Fishbane, S. (2002). A randomized controlled trial of N-acetylcysteine to prevent contrast nephropathy in cardiac angiography. *Kidney International*, 62, 2202-2207.

Effersøe, H., Rosenkilde, P., Groth, S., Jensen, L.I., Golman, K. (1990). Measurement of renal function with iohexol. A comparison of iohexol, 99mTc-DTPA, and 51Cr-EDTA clearance. *Investigative Radiology*, 25 (7), 778-782.

Eivindvik, K., Sjogren, C.E. (1995). Physicochemical Properties of Iodixanol. *Acta Radiologica*, 36 (suppl 399), 32-38.

Elliott, E.J., Simon, S.A. (1990). The anion in salt taste: a possible role for paracellular pathways. *Brain Research*, 535 (1), 9-17.

Erley, C.M., Bader, B.D., Berger, E.D., Vochazer, A., Jorzik, J.J., Dietz, K., Risler, T. (2001). Plasma clearance of iodine contrast media as a measure of glomerular filtration rate in critically ill patients. *Critical Care Medicine*, 29 (8), 1544-1550.

Fishbane, S., Durham, J.H., Marzo, K., Rudnick, M. (2004). N-acetylcysteine in the prevention of radiocontrast-induced nephropathy. *Journal of American Society of Nephrology*, 15, 251-260.

Fortin, M.-F., Côté, J., Filion, F. (2006). *Fondements et étapes du processus de recherche*. Montréal : Chenelière Éducation.

Fountaine, H., Harnish, P., Andrew, E., Grynne, B. (1996). Safety, tolerance and pharmacokinetics of iodixanol injection, a non-ionic, isosmolar, hexa-iodinated contrast agent. *Acta Radiologica*, 3 (3), s475-s484.

Frennby, B. (1996). Use of iohexol clearance to determine the glomerular filtration rate. A comparison between different clearance techniques in man and animal. From the department of diagnostic radiology, University of Lund.

Frennby, B., Sterner, G. (2002). Contrast media as markers of GFR. *European Radiology*, 12, 475-484.

Fung, J.W., Szeto, C.C., Chan, W.W., Kum, L.C., Chan, A.K., Wong, J.T., Wu, E.B., Yip, G.W., Chan, J.Y., Yu, C.M., Woo, K.S., Sanderson, J.E. (2004). Effect of N-acetylcysteine for prevention of contrast nephropathy in patients with moderate to severe renal insufficiency: a randomized trial. *American Journal of Kidney Diseases*, 43 (5), 801-808.

Gaspari, F., Perico, N., Ruggenti, P., Mosconi, L., Amuchastegui, C.S., Guerini, E., Daina, E., Remuzzi, G. (1995). Plasma clearance of nonradioactive iohexol as a measure of glomerular filtration rate. *Journal of the American Society of Nephrology*, 6(2), 257-263.

Gökkusu, C.A., Ozden, T.A., Gul, H., Yildiz, A. (2004). Relationship between plasma cystatin C and creatinine in chronic renal diseases and Tx-transplant subjects. *Clinical Biochemistry*, 37, 94-97.

Goldenberg, I., Shechter, M., Matetzky, S., Jonas, M., Adam, M., Pres, H., Elian, D., Agranat, O., Schwammenthal, E., Guetta, V. (2004). Oral acetylcysteine as adjunct

to saline hydration for the prevention of contrast-induced nephropathy following coronary angiography. A randomized controlled trial and review of the current literature. *European Heart Journal*, 25 (3), 212-218.

Grubb, A., Löfberg, H. (1982). Human  $\gamma$ -trace, a basic microprotein:amino acid sequence and presence in the adenohypophysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79, 3024-3027.

Grubb, A. (2000). Cystatin C-properties and use as diagnostic marker. *Advances in Clinical Chemistry*, 35, 63-99.

Grubb, A., Nyman, U., Björk, J., Lindström, V., Rippe, B., Sterner, G., Christensson, A. (2005). Simple cystatin C-based prediction equations for glomerular filtration rate compared with the modification of diet in renal disease prediction equation for adults and the Schwartz and the counahan-barratt prediction equations for children. *Clinical Chemistry*, 51 (8), 1420-1431.

Harmoinen, A., Lehtimäki, T., Korpela, M., Turjanmaa, V., Saha, H. (2003). Diagnostic accuracies of plasma creatinine, cystatin C and glomerular filtration rate calculated by the Cockcroft-Gault and Levey (MDRD) formulas. *Clinical Chemistry*, 49 (7), 1223-1225.

Hearne, C.R., Fraser, C.G. (1979). Enzymatic vs Jaffé assay of creatinine in serum. *Clinical Chemistry*, 25 (9), 1665-1666.

Heinrich, M.C., Kuhlmann, M.K., Grgic, A., Heckmann, M., Kramann, B., Uder, M. (2005). Cytotoxic effects of ionic high-osmolar, nonionic monomeric, and nonionic iso-osmolar dimeric iodinated contrast media on renal tubular cells in vitro. *Radiology*, 235, 843-849.

Hietala, S.-O. , Almén, T. (1989). Patient risk factors of importance in nephrotoxicity of contrast media. *International Congress Series 816*. Amsterdam, Excerpta Medica.

Hizoh, I., Haller, C. (2002). Radiocontrast-induced renal tubular cell apoptosis. *Investigative Radiology*, 37 (8), 428-434.

Hoffmann, U., Fischereder, M., Krüger, B., Drobnik, W., Krämer, B.K. (2004). The value of N-acetylcystein in the prevention of radiocontrast agent-induced nephropathy seems questionable. *Journal of the American Society of Nephrology*, 15, 407-410.

Hoffman, E., Stroobant, V. (2005). *Spectrométrie de masse*, Troisième édition, Paris : Éditions Dunod.

Hortin, G.L. (2006). Estimated glomular filtration Rates. A key role in addressing the epidemic of chronic kidney disease. *Clinical Laboratory News*, 32 (11), 9-12.

Houlihan, C., Jenkins, M., Osicka, T., Scott, A., Parkin, D., Jerums, G. (1999). A comparaison of the plasma disappearance of iohexol and 99mTc-DTPA for the measurement of glomerular filtration rate (GFR) in diabetes. *Australian and New Zealand Journal of Medicine*, 29, 693-700.

Idée, J.-M., Lancelot, E., Pines, E., Corot, C. (2004). Prophylaxis of iodinated contrast media-induced nephropathy: a pharmacological point of view. *Investigative Radiology*, 39 (3), 155-170.

Instituts de recherche en santé du Canada, Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada, Conseil de recherches en sciences humaines du Canada (1998). *Énoncé de politique des trois Conseils*. Ottawa : Approvisionnements et Services Canada. Document téléaccessible à l'adresse <<http://www.nserc.ca/programs/ethics/francais/policy.htm>> Consulté le 16 février 2005 et le 10 avril 2006.

Jacobsen, P.B., Larsen, A., Konarboland, R., Skotland, T. (1999). Biotransformation of nonionic x-ray contrast agents in vivo and in vitro. *Drug Metabolism and Disposition*, 27 (10), 1205-1213.

Jacobsen, P.B. (2000). On-line dialysis and quantitative high-performance liquid chromatography analysis of iodixanol in human, rat and monkey plasma. *Journal of chromatography B*, 749, 135-142.

Jenkins, M.A., Houlihan, C., Ratnaïke, S., Jerums, G., Des Parkin, J. (2000). Measurement of iohexol by capillary electrophoresis: minimizing practical problems encountered. *Annals of Clinical Biochemistry*, 37, 529-536.

Katzberg, R.W. (2005). Contrast medium-induced nephrotoxicity: which pathway ? *Radiology*, 235, 752-755.

Kitahashi, T., Furuta, I. (2004). Method development for determining the iohexol in human serum by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 34(1), 153-8.

Knight, E.L., Verhave, J.C., Spiegelman, D., Hillege, H.L., De Zeeuw, D., Curhan, G.C., De Jong. P.E. (2004). Factors influencing serum cystatin C levels other than renal function and the impact on renal function measurement. *Kidney International*, 65, 1416-1421.

Krutzen, E., Back, S.E., Nilsson-Ehle, I., Nilsson-Ehle, P. (1984). Plasma clearance of a new contrast agent, iohexol: a method for the assessment of glomerular filtration rate. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 10, 955.

Kurnik, B.R., Weisber, L.S., Cuttler, I.M., Kurnik, P.B. (1990). Effects of atrial natriuretic peptide versus mannitol on renal blood flow during radiocontrast infusion in chronic renal failure. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 116 (1), 27-36.

Kyhse-Andersen, J., Schmidt, C., Nordin, G., Andersson, B., Nilsson-Ehle, P., Lindstrom, V. , Grubb, A. (1994). Serum cystatin C, determined by a rapid, automated particle-enhanced turbidimetric method, is a better marker than serum creatinine for glomerular filtration rate. *Clinical Chemistry*, 40, 1921-1926.

Lee, S.-Y., Chun, M.-R., Kim, D.-J., Kim, J.W. (2006). Determination of iohexol clearance by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). *Journal of Chromatography B*, 839, 124-129.

Lepor, N.E. (2003). A review of contemporary prevention strategies for radiocontrast nephropathy: a focus on fenoldopam and N-acetylcysteine. *Reviews in cardiovascular medicine*, 4 (1), s15-s20.

Levey, A.S., Bosch, J.P., Lewis, J.B., Greene, T., Rogers, N., Roth, D. (1999). A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Annals of Internal Medicine*, 130, 461-470.

Levy, E., Viscoli, C., Horwitz, R. (1996). The effect of acute renal failure on mortality: a cohort analysis, *The Journal of the American Medical Association*, 275, 1489-1494.

Lin, J., Bonventre, J.V. (2005). Prevention of radiocontrast nephropathy. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 14, 105-110.

Löfberg, H. Grubb, A.O., Sveger, T., Olsson, J.E. (1980). The cerebrospinal fluid and plasma concentrations of  $\gamma$ -trace and  $\beta$ 2-microglobulinb at various ages and in neurological disorders. *Journal of Neurology*, 223, 159-170.

Lustgarten, J.A., Wenk, R.E. (1972). Simple, rapid kinetic method for serum creatinine measurement. *Clinical Chemistry*, 18, 1419-1422.

Maeder, M., Klein, M., Fehr, T., Rickli, H. (2004). Contrast nephropathy: review focusing on prevention. *Journal of the American College of Cardiology*, 44 (9), 1763-1771.

Manninen, H.I., Yang, X.M., Söder, H., Matsi, P.J., Borch, K.W., Eide, H. (1999). Comparaison of iodixanol 270 with iohexol 300 infrapopliteal arteriography. *Acta Radiologica*, 40, 291-295.

Marenzi, G., Assanelli, E., Marana, I., Lauri, G., Campodonico, J., Grazi, M., De Metrio, M., Galli, S., Fabbicchi, F., Montorsi, P., Veglia, F., Bartorelli, A.L. (2006). N-acetylcysteine and contrast-induced nephropathy in primary angioplasty. *The New England Journal of Medicine*, 354 (26), 2773-2782

Massey, D. (2004). Commentary: Clinical diagnostic use of cystatin C. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 18, 55-60.

Masson, P., Ohlsson, P., Björkhem, I. (1981). Combined enzymic-jaffé method for determination of creatinine in serum. *Clinical Chemistry*, 27 (1), 18-21.

McClennan, B.L., Stolberg, H.O. (1991). Intravascular Contrast Media. *Radiologic Clinics of North America*, 29 (3), 437-454.

McCullough, P.A., Wolyn, R., Roccher, L.L., Levin, R.N., O'Neill, W.W. (1997). Acute renal failure after coronary intervention: Incidence, risk factors, and relationship to mortality. *The American Journal of Medicine*, 103, 368-375.

McCullough, P.A. (2003). Beyond serum creatinine :defining the patient with renal insufficiency and why? *Review in Cardiovascular Medicine*, 4 (suppl 1), s2-6.

McCullough, P.A., Sandberg, K.A. (2003). Epidemiology of contrast-induced nephropathy. *Reviews in cardiovascular medicine*, 4 (suppl 5), s3-s9.

McCullough, P.A., Bertrand, M.E., Brinker, J.A., Stacul, F. (2006). A Meta-analysis of the renal safety of isosmolar iodixanol compared with low-osmolar contrast media. *Journal of the American College of Cardiology*, 48 (4), 692-699.

Merten, G.J., Burgess, W.P., Gray, L.V., Holleman, J.H., Roush, T.S., Kowalchuk, G.J., Bersin, R.M., Moore, A.V., Simonton, C.A., Rittase, R.A., Norton, H.J., Kennedy, T.P. (2004). Prevention of contrast-induced nephropathy with sodium bicarbonate. *The Journal of the American Medical Association*, 291 (19), 2328-2334.

Michelet, A.A. (1987). Effects of intravascular contrast media on blood-brain barrier. Comparaison between iothalamate, iohexol, iopentol and iodixanol. *Acta Radiologica*, 28, 329-333.

Ministère de la Santé et des Services sociaux (juin 1998). *Plan d'action ministériel en éthique de la recherche et en intégrité scientifique*. Document téléaccessible <[ftp://206.67.52.6/acrobat/f/documentation/1998/98\\_759.pdf](ftp://206.67.52.6/acrobat/f/documentation/1998/98_759.pdf)> Consulté le 16 février 2005 et le 10 avril 2006.

Morcos, S.K. (2005). Prevention of contrast media-induced nephrotoxicity after angiographic procedures. *Journal of Vascular and Interventional Radiology*, 16 (1), 13-23.

Morcos, S., Thomsen, H.S., Webb, J.A.W., members of the contrast media safety committee of the European Society of Urogenital Radiology (ESUR). (1999). Contrast media induced nephrotoxicity: A consensus reports. *European Radiology*, 9, 1602-1613.

Mudge, G.H. (1981). Nephrotoxicity of urographic radiocontrast drugs. *Kidney international*, 18, 540-552.

Mueller, C., Buerkle, G., Buettner, H.J., Petersen, J., Perruchoud, A.P., Eriksson, U., Marsch, S., Roskamm, H. (2002). Prevention of contrast media-associated nephropathy: randomized comparison of 2 hydration regimens in 1620 patients undergoing coronary angioplasty. *Archives of Internal Medicine*, 162 (3), 329-336.

Murphy, S., Barrett, B.J. (2000). Contrast nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*, 11, 117-182.

Mussap, M., Ruzzante, N., Varagnolo, M.C., Plebani, M. (1998). Quantitative automated particle-enhanced immunonephelometric assay for the routinary measurement of human cystatin C. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 36, 859-865.

Nilsson-Ehle, P., Grubb, A. (1994). New markers for the determination of GFR: Iohexol clearance and cystatin C serum concentration. *Kidney International*, 46 (supp.47), s17-s19.

Norlund, L., Fex, G., Lanke, J., Von Schenck, H., Nilsson, J.-E., Leksell, H., Grubbm A. (1997). Reference intervals for the glomerular filtration rate and cell-profiliration markers: serum cystatin C and serum  $\beta$ 2-microglobulind/cystatin C-ratio. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 57, 463-470.

Nossen, J.O., Jacobsen, A., Kjaersgaard, P., Andrew, E., Jacobsen, P.B., Berg, K.J. (1995). Elimination of the non-ionic X-ray contrast media iodixanol and iohexol in patients with severely impaired renal function. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 55, 341-350.

Oudemans-Van Straaten, H.M. (2004). Contrast nephropathy, pathophysiology and prevention. *The International Journal of Artificial Organs*, 27 (12), 1054-1065.

Page, C.P., Curtis, M.J., Walker, M.J., Sutter, M.C. et Hoffman, B.B. (1999). *Pharmacologie intégrée*. Paris : DeBoeck Université.



Page, M.K., Bukki, J., Luppia, P., Neumeier, D. (2000). Clinical value of cystatin C determination. *Clinica Chimica Acta*, 297, 67-72.

Perlman, H., Maillard, L., Krasinski, K., Walsh, K. (1997). Evidence for the rapid onset of apoptosis in medial smooth muscle cells after balloon injury. *Circulation*, 95, 981-987.

Perrone, R.D., Madias, N.E., Levey, A.S. (1992). Serum creatinine as an index of renal function: new insights into old concepts. *Clinical Chemistry*, 38, 1933-1953.

Persson, P.B., Patzak, A. (2005). Renal haemodynamic alterations in contrast medium-induced nephropathy and the benefit of hydration. *Nephrology dialysis transplantation*, 20 (1), i2-i5.

Pollman, M., Hall, J.L., Gibbons, G.H. (1999). Determinants of vascular smooth muscle cell apoptosis after balloon angioplasty injury. *Circulation Research*, 84, 113-121.

Price, C.P., Finney, H. (2000). Developments in the assessment of glomerular filtration rate. *Clinica Chimica Acta*, 297, 55-66.

Putschew, A., Schittko, S., Jekel, M. (2000). Quantification of triiodinated benzene derivatives and X-ray contrast media in water samples by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 930 (1-2), 127-134.

Rich, M.W., Crecelius, G. (1990). Incidence, risk, factors, and clinical course of acute renal insufficiency after cardiac catheterization in patients 70 years of age or older. *Archives of Internal Medicine*, 150, 1237-142.

Rickli, H., Benou, K., Ammann, P., Fehr, T., Brunner-La Rocca, H.P., Petridis, H., Riesen, W., Wuthrich, R.P. (2004). Time course of serial cystatin C levels in comparison with serum creatinine after application of radiocontrast media. *Clinical Nephrology*, 61 (2), 98-102.

Rouessac, F. et Rouessac, A. (2004). *Analyse chimique : méthodes et techniques instrumentales modernes. Cours et exercices corrigés* (6<sup>e</sup> éd.). Paris : Dunod.

Safirstein, R., Andrade, L., Vieira, J.M. (2000). Acetylcysteine and nephrotoxic effects of radiographic contrast agents- a new use for an old drug. *The New England Journal of Medicine*, 343 (3), 210-212.

Schick, C.S., Haller, C. (1999). Comparative cytotoxicity of ionic and non-ionic radiocontrast agents on MDCK cell monolayers in vitro. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, 14 (2), 342-347.

Schröder, R. Contrast material-induced renal failure: An Overview. *Journal of Interventional Cardiology*. 2005, 18 (6), 417-423.

Schuck, O., Teplan, V., Sibova, J., Stollova, M. (2004). Predicting the glomerular filtration rate from serum creatinine, serum cystatin C and the Cockcroft and Gault formula with regard to drug dosage adjustment. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 42 (2), 93-97.

Shah, V.P., Midha, K.K., Findlay, J.W., Hill, H.M., Hulse, J.D., McGilveray, I.J., McKay, G., Miller, K.J., Patnaik, R.N., Powell, M.L., Tonelli, A., Viswanathan, C.T., Yacobi, A. (2000). Bioanalytical method validation - a revisit with a decade of progress. *Pharmaceutical Research*, 17, 1551-1557.

Shihabi, S.K. , Constantinescu, M.S. (1992). Iohexol in serum determined by capillary electrophoresis. *Clinical Chemistry*, 38 (10), 2117-2120.

Simonsen, O., Grubb, A., Thysell, H. (1985). The blood serum concentration of cystatin C (gamma-trace) as a measure of the glomerular filtration rate. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 45, 97-102.

Skoog, D.A., Holler, F.J. et Nieman, T.A. (2003). *Principes d'analyse instrumentale*. Paris: DeBoeck.

Solomon, R., Werner, C., Mann, D., D'Elia, J. , Silva, P. (1994). Effects of saline, mannitol et furosemide on acute decreases in renal function induced by radiocontrast agents. *The New England Journal of Medicine*, 331 (21), 1416-1420.

Solomon, R. (1998). Contrast-medium-induced acute renal failure. *Kidney International*, 53, 230-242.

Stolberg, H.O., McClennan, B.L. (1991). Ionic versus nonionic contrast use. *Currents Problems in Diagnostic Radiology*, March/April, 47-88.

Svaland, M.G., Haider, T., Langseth-Manrique, K., Andrew, E. , Hals, P.A. (2002) Human Pharmacokinetics of Iodixanol. *Investigative Radiology*, 27, 130-133.

Tang, L., Thibault, P., Boyd, R.K. (1993). Fragmentation reactions of multiply-protonated peptides and implications for sequencing by tandem mass spectrometry with low-energy collision-induced dissociation. *Analytical Chemistry*, 65 (20), 2824-2834.

Taussky, H.H. (1956). A procedure increasing the specificity of Jaffé reaction for the determination of creatine and creatinine in urine and plasma. *Clinical Chimica Acta*, 1, 210-224.

Tepel, M., Van der Giet, M., Schwarzfeld, C., Liermann, D., Zidek, W. (2000). Prevention of radiographic-contrast-agent-induced reductions in renal function by acetylcysteine. *The New England Journal of Medicine*, 343 (3), 180-184.

Tepel, M., Aspelin, P., Lameire, N. (2006). Contrast-induced nephropathy: a clinical and evidence-based approach. *Comprehensive Cardiology*, 3, 37-44.

The National Commission for the Protection of Human Subjects on Biomedical and Behavioral Research (1982). *Belmont Report : Ethical Principles and Guidelines for the Protection of Human Subjects of Research*.

Thomsen, H.S. (2001). Contrast-medium-induced nephrotoxicity: are all answers in for acetylcysteine? *European Radiology*, 11, 2351-2353.

Thomsen, H., Morcos, S. (2003). Contrast media and the kidney: European society of Urogenital Radiology (ESUR): Guidelines. *The British Journal of Radiology*, 76, 513-518.

Tortora, G.J., Raynolds Grabowski, S., Parent, J-C. (1999). *Principes d'anatomie et de physiologie*. Canada : CEC collégial et universitaire.

Tribunal militaire de Nuremberg (1947). *Le Code de Nuremberg*. Document téléaccessible <[http://www.cybercable.tm.fr/~biblio/serment\\_nuremberg.html](http://www.cybercable.tm.fr/~biblio/serment_nuremberg.html)> Consulté le 16 février 2005 et le 10 avril 2006.

Vinge, E., Lindergard, P., Nilsson-Ehle, P., Grubb, A. (1999). Relationships among serum cystatin C, serum creatinine, lean tissue mass and glomerular filtration rate in healthy adults. *Scand J Clin Lab Invest*, 59, 587-592.

Voet, D. et Voet, J.G. (2002). *Biochimie*. Paris: De Boeck Université.

Walsh, C.T., Schwartz-Bloom, R.D. (2005). *Levine's pharmacology: Drug actions and reactions*. London: Taylor & Francis.

Xia, L.H., Bing, X.G., An, X.T. (2004). Serum cystatin C assay for the detection of early renal impairment in diabetic patients. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 18, 31-35.

Xu, X., Zou, J., Ding, X., Xin, D., Ren, Y. (2004). Clinical value of serum cystatin C by ELISA for estimation of glomerular filtration rate. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 18, 61-64.

## **ANNEXE A**

**VALIDATION CLINIQUE DE LA DÉTERMINATION DE LA CYSTATINE C  
PLASMATIQUE COMME MARQUEUR FIABLE DE LA FONCTION RÉNALE**

CHM 5011  
STAGE PROFESSIONNEL

TRAVAIL PRÉSENTÉ À :  
MME LUCIE LAMONTAGNE

VALIDATION CLINIQUE DE LA DÉTERMINATION DE LA CYSTATINE C  
PLASMATIQUE COMME MARQUEUR FIABLE DE LA FONCTION RÉNALE

par  
Marie-Claude Denis  
DENM13528006

Jean Cusson, MD PhD FRCPC  
Professeur agrégé, Faculté de médecine, Université de Sherbrooke  
Médecine interne et pharmacologie clinique Hôpital Charles LeMoyne

Daniel Lesiège, MD MSc, Médecin Biochimiste  
Département de biochimie, Hôpital Charles LeMoyne

Université du Québec à Montréal  
30 août 2004

## RÉSUMÉ

Afin de mettre en œuvre des mesures de protection de la fonction rénale des sujets à risque, il faut pouvoir diagnostiquer l'insuffisance rénale et suivre son évolution. La créatinine plasmatique (pCr) ainsi que sa clairance sont les marqueurs conventionnels afin de déterminer une diminution du débit de filtration glomérulaire.<sup>1</sup> Mais, ils sont toutefois peu spécifiques et peu sensibles. Récemment plusieurs études ont suggéré l'utilisation de la mesure plasmatique d'un autre marqueur endogène: la cystatine C (pCys C), en vertu de sa grande fiabilité et de ses qualités exceptionnelles. Chez des sujets ayant différents niveaux de fonction rénale, la pCys C est-elle toujours plus fiable que la pCr comme marqueur rénal à court terme ? La détermination de pCys C semble être prometteuse car 1) les coefficients de variation inter-sujets et intra-sujet (à trois reprises à des intervalles de 24h) sont faibles chez des sujets sains et 2) une corrélation significative existe entre pCys C et les trois paramètres de la filtration glomérulaire étudiés, soient pCr, clairance mesurée (CrCrM) et calculée en créatinine, chez des sujets ayant une ClCrM inférieure à 50 mL/min. De plus, Il semble bien que pCys C et pCr changent dans des directions similaires lorsqu'une insuffisance rénale aiguë ou subaiguë s'améliore. Par conséquent, la mesure de la pCys C chez des sujets avec divers degrés d'insuffisance rénale à court terme discrimine bien le niveau de fonction rénale, tout comme d'ailleurs la mesure de pCr.

## INTRODUCTION

Parmi les problèmes de santé dont le fardeau pour le sujet et la société est lourd, l'insuffisance rénale est devenue l'un des plus importants, et depuis quelques années, on met au point diverses modalités novatrices d'intervention visant à réduire son incidence. Dans le but de mettre en œuvre et d'évaluer des mesures de protection de la fonction rénale des sujets à risque, il faut pouvoir la diagnostiquer et en suivre son évolution. La concentration sérique en créatinine et le calcul de sa clairance sont les marqueurs conventionnels permettant d'évaluer la fonction rénale. Mais, comme témoin des changements du débit (ou taux) de filtration glomérulaire (DFG), ces marqueurs sont peu spécifiques et peu sensibles en présence de certains facteurs de comorbidité, tels une masse musculaire diminuée, la présence d'une cirrhose hépatique ou d'une arthrite rhumatoïde traitée aux anti-inflammatoires non-stéroïdiens.<sup>1</sup>

Le DFG est considéré comme la mesure étalon de la fonction rénale. Une diminution du DFG précède les anomalies métaboliques et permet de quantifier et de classer le degré d'atteinte rénale. L'un des marqueurs permettant de diagnostiquer un changement du DFG est le taux de créatinine sérique, il est la résultante de la production de la créatinine par les muscles squelettiques, et son élimination est essentiellement rénale.<sup>2</sup> Toutefois, une créatininémie normale ne témoigne pas toujours d'une fonction rénale normale; les sujets ayant une faible masse musculaire et une fonction rénale basse peuvent avoir une créatininémie normale.<sup>3</sup> Or, tout récemment, plusieurs études ont suggéré l'utilisation de la mesure plasmatique d'un autre marqueur endogène pour l'évaluation du DFG : la cystatine C, molécule identifiée plusieurs années auparavant.<sup>4</sup>



La Cystatine C est une protéine endogène produite de façon constante par un gène domestique («housekeeping gene») des cellules nucléées.<sup>5</sup> C'est un polypeptide non-glycosylée de forme ellipsoïde ( 30 par 45 Å ),<sup>6</sup> de poids moléculaire de 13.359 kD, constitué de 120 acides aminés ayant deux ponts disulfures (entre les cys : 73- 83 et 97-117).<sup>7</sup> Connue également sous le nom de  $\gamma$ -trace et post- $\gamma$ -globuline, la cystatine C traverse aisément la membrane glomérulaire grâce à son faible poids moléculaire ainsi que sa charge positive. Elle n'est pas sécrétée par les cellules épithéliales du tubule proximal rénal comme la créatinine mais elle est plutôt réabsorbée par celles-ci. Une fois, que la Cystatine C est réabsorbée, elle est catabolisée par les cellules épithéliales du tubule proximal sans retourner dans le système sanguin.<sup>3</sup>

De plus, non seulement ce marqueur permet de dépister une diminution de DFG <sup>8</sup> mais on a suggéré qu'il pourrait être plus fiable que la créatinine, de même que d'autres protéines de faible poids moléculaire comme la  $\beta_2$ -microglobuline.<sup>4</sup> Son indépendance à plusieurs facteurs, dont la masse musculaire, l'âge et le sexe du sujet, pourrait faire de la cystatine C, le marqueur endogène idéal. Sans omettre qu'une seule mesure sérique serait suffisante afin de déterminer tous les paramètres nécessaires au diagnostic du niveau de la fonction rénale. En 2000, Price et Finney <sup>9</sup> démontrent qu'il n'est pas facile de déterminer le DFG chez leurs sujets puisqu'ils doivent avoir recours à une collecte urinaire de 24 heures pour le calcul de la clairance de la créatinine en plus d'un prélèvement sanguin extemporané pour évaluer le taux de créatinine sérique. Ainsi, par sa simplicité d'utilisation, la cystatine C serait un grand atout pour évaluer la fonction rénale d'une grande diversité de sujets, i.e. des enfants, des personnes âgées, des personnes alitées ou des sujets porteurs de transplants rénaux.

Avec l'usage croissant de substances de contraste iodée (pour la tomodensitométrie ou l'angiographie par exemple) lors d'analyse par imagerie médicale, l'incidence de la dysfonction rénale transitoire ou permanente est à la hausse, en particulier chez les personnes âgées. C'est ce que l'on appelle la néphropathie due à l'exposition aux substances de contraste (NESC). La NESC est à ce point préoccupante qu'elle vient au troisième rang des causes d'hospitalisation en néphrologie.<sup>10</sup> Plusieurs études ont démontré que le niveau de créatinine, chez les sujets ayant subi un examen d'imagerie médicale impliquant une substance de contraste, augmentait uniquement après 24-48 heures post-imagerie et retournait à son niveau de base après 7 à 10 jours. Ce qui a permis de confirmer qu'il est pratiquement impossible de diagnostiquer une néphropathie liée aux substances de contraste en quelques heures. Toutefois, l'étude de Rickli de cette année <sup>10</sup> démontre que le niveau de cystatine C commence à diminuer après 24 heures et peut être fixe après 48 heures chez des sujets n'ayant aucune dysfonction rénale.

De plus, des études récentes suggèrent que les performances analytiques de la cystatine C, en terme de qualité, exactitude et précision, sont idéales. Une seule réaction, entre l'antigène (cystatine C) et l'anticorps spécifique contre ce même antigène, provoque la précipitation de la protéine cystatine C en un immunocomplexe, antigène-anticorps-microparticule. La précipitation d'immunocomplexe peut être détectée et quantifiée par turbidimétrie ou néphélométrie.<sup>11</sup> La prise de médicaments, la lipémie et l'ictère n'interféreraient pas sur la détection de la cystatine C. Donc, la facilité d'automatisation est possible dans les centres hospitaliers ayant des multianalyseurs.<sup>12</sup>

Malgré les publications qui prônent la fiabilité et les qualités exceptionnelles de la cystatine C comme marqueur de la fonction rénale; qu'en est-il chez des sujets ayant différents niveaux de fonction rénale, la cystatine C plasmatique (pCys C) est-elle toujours plus fiable que la créatinine plasmatique comme marqueur rénal à court terme?

Nous avons donc élaboré un projet pour évaluer la fiabilité de la pCys C comme marqueur de la fonction rénale et le comparer à la créatinine sérique. Le projet comprend deux devis de recherche, un premier transversal inter-individuel et un second intra-individuel et dynamique à court terme.

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

### **Sujets et devis**

Le projet a été approuvé par le Comité d'éthique de la recherche de l'Hôpital Charles LeMoyne.

Le volet inter-individuel transversal de l'étude a été prévu pour un échantillon de 80 sujets dont la plus récente clairance de créatinine est inférieure à 50 mL/min (ou 0.83 mL/sec). La taille de l'échantillon a été sélectionnée principalement pour des raisons logistiques (durée du stage, disponibilité et coût de la méthodologie analytique, etc). Les sujets ont été dans la mesure du possible répartis également selon le sexe et leur indice de masse corporelle (IMC) : définit comme le poids en kg divisé par la surface corporelle exprimée en m<sup>2</sup>. Le seuil de 30 a été sélectionné arbitrairement mais correspond à l'usage habituel en recherche clinique.

Le second volet, intra-individuel et dynamique est prévu pour 20 sujets dans un premier sous-groupe et une taille d'échantillon 40 sujets fut sélectionnée dans un deuxième sous-groupe. Dans le premier sous-groupe, les critères d'inclusion étaient l'insuffisance rénale aiguë et un potentiel d'amélioration à court terme de la fonction rénale suite à une réhydratation (cas d'insuffisance pré-rénale) ou encore après la levée d'une obstruction (insuffisance post-rénale). Dans le deuxième sous-groupe, les sujets recrutés étaient connus porteurs d'une insuffisance rénale (clairance de créatinine calculée inférieure à 50 mL/min) et devaient subir un examen d'imagerie médicale (tomodensitométrie et/ou angiographie) avec exposition aux substances de contrastes iodées, donc des sujets à risque de développer une néphropathie secondaire liée aux substances de contraste.

Pour tous les sujets, un échantillon de sang de 10mL a été prélevé afin de déterminer la pCys C, en même temps que celui prévu cliniquement pour la créatinine plasmatique (pCr). Les analyses de pCys C et pCr n'exigent pas que les sujets soient à jeun, à moins que les conditions pré-analytiques de d'autres examens le requièrent.

Dans le volet inter-individuel transversal, les échantillons sanguins proviennent principalement de sujets externes dont l'identité a été dénominalisée. Dix (10) mL de sang ont été conservé pour chacun de ces sujets afin d'analyser la pCys C; plusieurs sujets participant à ce volet ont par ailleurs participé dans le contexte d'une évaluation de la clairance de la créatinine à la demande de leur médecin, et ont signé un formulaire de consentement. Les sujets dans le volet dynamique intra-individuel ont également signé un formulaire de consentement leur expliquant l'étude, les prélèvements sanguins ainsi que le dosage de la pCys

C. Dans le sous-groupe 1 de ce volet dynamique, 3 prélèvements de 10 mL de sang ont été effectués à intervalles de 1 à 2 jours. Alors que pour le sous-groupe 2 du même volet, 4 prélèvements de 10 mL de sang ont été effectués, soit 1 prélèvement avant l'exposition de l'examen d'imagerie utilisant une substance de contraste et 3 prélèvements post-imagerie : 4 à 6 heures, 20 à 28 heures et 48 à 72 heures.

Chez les 6 sujets sains, les mesures se sont faites le midi pendant 3 jours consécutifs, alors que les sujets vivaient à leurs activités quotidiennes sans aucune restriction alimentaire.

### **Paramètres d'intérêt**

Le projet visait spécifiquement à évaluer 1) la précision du dosage de pCys C, 2) la capacité du dosage de la pCys C à différencier différents niveaux d'insuffisance rénale et 3) la sensibilité de la pCys C à des changements court terme de DFG. Donc, nos paramètres d'intérêts furent la pCysC, la pCr, la clairance de créatinine mesurée (ClCrM) et la clairance de créatinine calculée (ClCrC). Mais comme l'âge, le poids, et le sexe influence le DFG tel que mesuré par la pCr et la ClCrC, nous avons également évalué l'impact de ces facteurs.

La pCys C a été déterminée comme dans la section de Matériels et Méthodes, décrite plus loin. La pCr a été déterminée par la méthode conventionnelle en cours à l'Hôpital Charles LeMoyne, soit à l'aide de la méthode de Jaffé en cinétique compensée sur un Hitachi 917 (Roche Diagnostiques). La ClCrM a été calculée selon l'équation usuelle UV/P où UV représente la quantité ( $\mu\text{mol/min}$ ) de créatinine urinaire dans l'échantillon de 24 h, et P est la

concentration de pCr ( $\mu\text{mol/mL}$ ). Alors que la ClCrC se calcule avec l'équation de Cockcroft et Gault<sup>3</sup> comme suit :

$$\frac{(140 - \text{âge (années)}) \times \text{poids (kg)}}{\text{créatinine sérique } (\mu\text{mol/L}) \times 0.8}$$

Si le volontaire sain est une femme le résultat de la formule est multiplié par un facteur de 0.85,<sup>10</sup> afin de compenser la différence de masse musculaire avec celle des hommes.

### **Méthodologie analytique pour pCys C**

La pCys C a été déterminée de la même façon pour tous les volets de l'étude ainsi que pour tous les sous-groupes de sujets. Les prélèvements sanguins ont été effectués par ponction au niveau de la veine antécubitale d'un des deux bras et le sang recueilli dans des tubes de silicone sous vide d'une capacité de 5 mL (provenant de la compagnie Vacutainer) contenant un gel inerte en guise de séparateur. Après chaque prélèvement sanguin, tous les tubes ont été centrifugés à 3000g pendant 15 minutes et décantés afin de ne conserver que le sérum, puis congelés à  $-70^{\circ}\text{C}$  sous forme d'aliquote de 1 mL jusqu'à l'analyse de la pCys C par immunoturbidimétrie à l'aide d'un mutianalyseur (Olympus AU 640) contenant un turbidimètre. Tous les réactifs nécessaires pour analyser la cystatine C ont été obtenus de la compagnie DakoCytomation .

Le multianalyseur est calibré avec 6 standards de différentes concentrations de cystatine C humaine produite par *Escherichia Coli*. Toutefois, le réactif permettant d'effectuer les standards était de concentration initiale de 7.68 mg/L ainsi des dilutions avec du NaCl de 154 mmol/L (0.9% W/V) ont été

réalisées afin d'obtenir des standards de concentration différentes soient : 0.404 mg/L, 0.768 mg/L, 1.92 mg/L, 3.29 mg/L, 4.65 mg/L et 7.68 mg/L. Après la calibration du multianalyseur, deux solutions de contrôle contenant toujours de la cystatine humaine produite par *E.Coli* ont été analysées avec des concentrations de 4.82 mg/L (intervalles de références : 4.10 à 5.54 mg/L) et de 1.38 mg/L (intervalles de références : 1.17 à 1.59 mg/L). Lorsque la calibration et les contrôles sont bien effectués et donnent des valeurs attendues dans les intervalles de références, il est possible de procéder à l'analyse de la pCys C des sujets.

Le multianalyseur requiert 2,5µL d'échantillon (sérum de chaque sujet) auquel il ajoute 230µL d'une solution tampon de MOPS à pH 7.1 à 7.4. Puis, 50µL de la suspension d'immunoparticules, de diamètre de 40 à 300 nm, sur lesquelles sont fixées de façon covalente des d'immunoglobulines purifiées de lapin dirigées contre la cystatine C. Toutes ces solutions contiennent de l'azote de sodium comme agent de conservation. La spécificité de l'anticorps, avant le couplage aux particules, a été établie par immunoélectrophorèse croisée, seul l'arc de la cystatine C apparaissait lorsque l'anticorps était testé contre de l'urine concentrée provenant de sujets atteints de protéinurie tubulaire. Une cystatine C humaine recombinante purifiée produite par *E.Coli* est également utilisée comme immunogène afin d'augmenter l'efficacité de l'anticorps. Ainsi, les immunocomplexes obtenus sont mesurés par turbidimétrie à 540 nm. Le signal généré est corrélé à la concentration en cystatine C dans l'échantillon puis calculé par interpolation sur la courbe standard. Pour des sujets âgés de 50 ans et moins ayant un taux de filtration glomérulaire de 80 mL/min, les intervalles de références sont de 0.55 à 1.15 mg/L. Alors que pour les sujets de plus de 50 ans ayant un taux de filtration glomérulaire qui diminue en fonction du temps, les

intervalles de références sont 0.63 à 1.44 mg/L. Ces intervalles de références ont été estimés sur une population de 70 sujets âgés de 50 ans ou moins et de 95 sujets âgés de plus de 50 ans, tous ayant un taux de filtration glomérulaire normal, soit de 80mL/min /1.73m<sup>2</sup> pour les sujets de moins de 50 ans alors que pour les sujets de plus de 50 ans d'âge, le taux de filtration glomérulaire diminue avec l'âge.<sup>13</sup>

À la fin août 2004, tous les sujets dans le volet transversal et dynamique n'ont pas encore été recrutés et les résultats sont donc partiels à ce moment-ci.

La précision et la reproductibilité de l'analyse de la pCys C ont été calculées chez des volontaires sains. Par la suite, il a été possible de considérer empiriquement que seules des différences éventuelles inter-sujets ou encore intra-sujet (évolution dans le temps) supérieures au coefficient de variation le plus élevé pouvaient être considérées cliniquement significatifs.

Le logiciel SAS a été utilisé pour les analyses statistiques, principalement des analyses de variance et régression logistiques. Les relations entre les niveaux de pCys C et le taux circulant de pCr, la clairance mesurée et celle calculée de la créatinine (ClCrM et ClCrC) ont été estimées à l'aide du coefficient de Pearson ( $r$  qui est égal à la racine carrée de  $r^2$ ). L'impact potentiel de l'âge, du sexe et du poids sur ces corrélations (pCr vs pCys C et pCys C vs ClCrM) a aussi été examiné par une analyse de covariance. Nous avons utilisé le seuil statistique de  $p < 0,05$ .



## **RÉSULTATS**

### **Courbe standard du dosage de pCys C**

L'évaluation des concentrations de protéines pCys C est possible à l'aide du multianalyseur (Olympus AU 640 contenant un turbidimètre) qui a été calibré par une courbe standard (voir figure 1 dans annexe 1, p.163). Six standards de concentrations différentes (0.404 mg/L, 0.768 mg/L, 1.92 mg/L, 3.29 mg/L, 4.65mg/L et 7.68 mg/L) de cystatine C humaine produite par *Escherichia Coli* ont été utilisés afin de réaliser cette courbe. Chaque lecture de densité optique par le multianalyseur à une longueur d'onde de 540 nm révèle une concentration de protéine cystatine C en mg/L. Suite à la calibration du multianalyseur, deux solutions de contrôle contenant toujours de la cystatine C humaine produite par E.Coli ont été analysées avec des concentrations initiales de 4.82 mg/L (C1) (intervalles de références : 4.10 à 5.54 mg/L) et de 1.38 mg/L (C2) (intervalles de références : 1.17 à 1.59 mg/L). Trois échantillons de chacun de ces contrôles ont été analysés, soit un avant chacun des dosages, avec une concentration moyenne de cystatine C de 4.568 mg/L (écart-type moyen de 0.0439 mg/L et de coefficient de variation de 0.962%) pour le contrôle C1. Alors que pour le contrôle C2, la moyenne de la concentration pour les trois échantillons de cystatine C est de 1.366 mg/L (écart-type de 0.0279 mg/L et de coefficient de variation de 2.04%).

### **Précision et reproductibilité de l'analyse de la pCys C**

La détermination de pCr et pCys C chez 6 volontaires sains à trois reprises à intervalle d'un jour (voir tableau I dans annexe 1, p.165) donne un coefficient de variation intra-sujet de 5% (Jour 1 à 3) tant pour pCys C que pCr. Par ailleurs, au

jour 1 (0 heure), le coefficient de variation inter-sujets fut de 2% pour ces 2 paramètres (résultats non illustrés).

### **Volet transversal**

Il existe une corrélation linéaire positive ( $r = 0.635$ ) entre la pCys C et la pCr (voir figure 1 dans annexe 2, p.166). Les figures 2 et 3 dans l'annexe 2 (p.167-168) montrent également l'existence de corrélation linéaire positive entre la pCys C et la ClCrM ( $r = 0.751$ ). Par contre, ni l'âge, le sexe, le poids, la taille ou l'IMC n'ont semblé influencer statistiquement ces corrélations (voir tableau II dans annexe 1, p.165).

### **Volet dynamique**

Premier sous-groupe de sujets : cinq sujets étaient en situation d'insuffisance rénale aiguë chez qui une réhydratation (cas d'insuffisance pré-rénale) ou encore la levée d'une obstruction (insuffisance post-rénale) devait provoquer à court terme une amélioration de la fonction rénale. Les concentrations de pCr et de la pCys C ont été mesurées de façon sériées à trois reprises à des intervalles de 1-2 jours (24-48heures) entre les prises (voir figure 1 dans annexe 3, p.169). Les concentrations de la pCr ainsi que celles de la pCys C ont diminuées dans le même sens pour chacun des intervalles de temps.

Deuxième sous-groupe de sujets : six sujets sont recrutés connus porteurs d'une insuffisance rénale (clairance de créatinine calculée inférieure à 50 mL/min) et qui devaient subir un examen d'imagerie médicale (tomodensitométrie et/ou angiographie) avec substances de contrastes iodées, donc des sujets à risque de développer une néphropathie secondaire liée aux substances de contraste. Un

dosage de la pCr et de la pCys C pré-imagerie a été réalisé contre trois dosages post-imagerie dans des intervalles de temps de 4 à 6 heures, 20-28 heures et de 48 à 72 heures (voir figure 2 dans annexe 3, p.170 ). Les concentrations de pCr et de pCys C diminuent après 4 à 6 heures post-imagerie. Toutefois, les concentrations de pCr et de pCys C augmentent à 20 à 28 heures post-imagerie pour redescendre par la suite à 48 à 72 heures.

### *DISCUSSION*

Plusieurs articles scientifiques prônent la fiabilité et les qualités exceptionnelles de la pCys C comme marqueur de la fonction rénale. La détermination de pCys C semble en effet prometteuse vu 1) le faible coefficient de variation inter-sujets chez des sujets sains, 2) le faible coefficient de variation intra-sujet lorsque déterminé chez des sujets sains à 3 reprises à intervalle de 24h, et 3) la corrélation significative entre pCys C et les trois paramètres de la filtration glomérulaire étudiés, soient pCr, ClCrM et ClCrC chez des sujets ayant une ClCrM inférieure à 50 mL/min. Ces corrélations pourraient s'expliquer par le fait que la Cystatine C et la créatinine peuvent en effet être de bons témoins du DFG vu leurs caractéristiques biochimiques.<sup>1</sup> Nous avons de plus trouvé que ces corrélations étaient indépendantes de variables autrement connues pour influencer la pCr. Le dosage de pCys C pourrait donc être utilisé pour donner un estimé du DFG chez un sujet donné.

Les résultats partiels du volet intra-individuel et dynamique à court terme, limitent l'étendue de nos commentaires. Il semble bien selon nos données à date que pCys C et pCr changent dans des directions similaires lorsqu'une insuffisance rénale aigue ou subaigue s'améliore. Cependant, il nous est particulièrement

difficile présentement de porter un jugement sur les données encore fragmentaires pour les sujets exposés aux substances de contraste. Toutefois, l'observation des résultats des concentrations de la pCr et de la pCys C (voir figure 2 annexe 3, p.24) illustrent bien la concentration maximale des deux marqueurs de la fonction rénale à un intervalle de 20 à 28 heures post-imagerie pour redescendre par la suite. La littérature, par contre, démontre que la pCr aurait dû diminuer seulement 48 heures post-imagerie pour retourner à son niveau de base après 7 à 10 jours alors que; pour ce qui est de la pCys C, elle aurait dû commencer à diminuer après 24 heures post-imagerie et retourner à son niveau de base après 48 heures pour des sujets chez qui aucune dysfonction rénale n'auraient été diagnostiquée.<sup>10</sup> Par conséquent, des résultats comme ceux de la littérature étaient attendus dans ce sous-groupe de sujet puisque la cystatine C, n'étant pas sécrétée par les cellules épithéliales du tubule proximal rénal comme la créatinine, est libérée plus rapidement par le néphron.<sup>14</sup>

Enfin, une des limites de notre étude et qui touche également tous les articles publiés chez l'humain à date, c'est le fait que nous n'avons pu mesurer directement la filtration glomérulaire chez nos sujets et alors comparer pCys C et pCr à cette mesure directe. En fait, deux marqueurs sont principalement reconnus pour la mesure étalon de la filtration glomérulaire soit la clairance de l'inuline (polysaccharide complètement filtrée par la membrane du glomérule, sans être sécrété ni réabsorbé comme la pCys C)<sup>15</sup> et la clairance du <sup>99</sup>Tc<sup>m</sup> DTPA (marqueur utilisé en imagerie nucléaire)<sup>16</sup>. Dans le cas de l'inuline, sa détermination dans le plasma comportait des obstacles méthodologiques trop nombreux pour le contexte de ce projet-ci, et dans le cas du <sup>99</sup>Tc<sup>m</sup> DTPA, sa mesure signifie une exposition des sujets à un radio-isotope, exposition qui ne

semblait pas justifiée *a priori* pour ce projet. Ainsi, l'absence d'étalon d'or ne nous permet pas de savoir si pCys C est un meilleur témoin du DFG que pCr.

En conclusion, la mesure de la pCys C requiert une méthodologie peu complexe et automatisable et son coefficient de variation est faible. Comme d'autres l'ont récemment documenté, la mesure de la pCys C chez des sujets avec divers degrés d'insuffisance rénale discrimine bien le niveau de fonction rénale, tout comme d'ailleurs la mesure de pCr. Par contre, la pCys C ne semble pas être influencée par le sexe, l'âge ou le poids des sujets.

### **Remerciements**

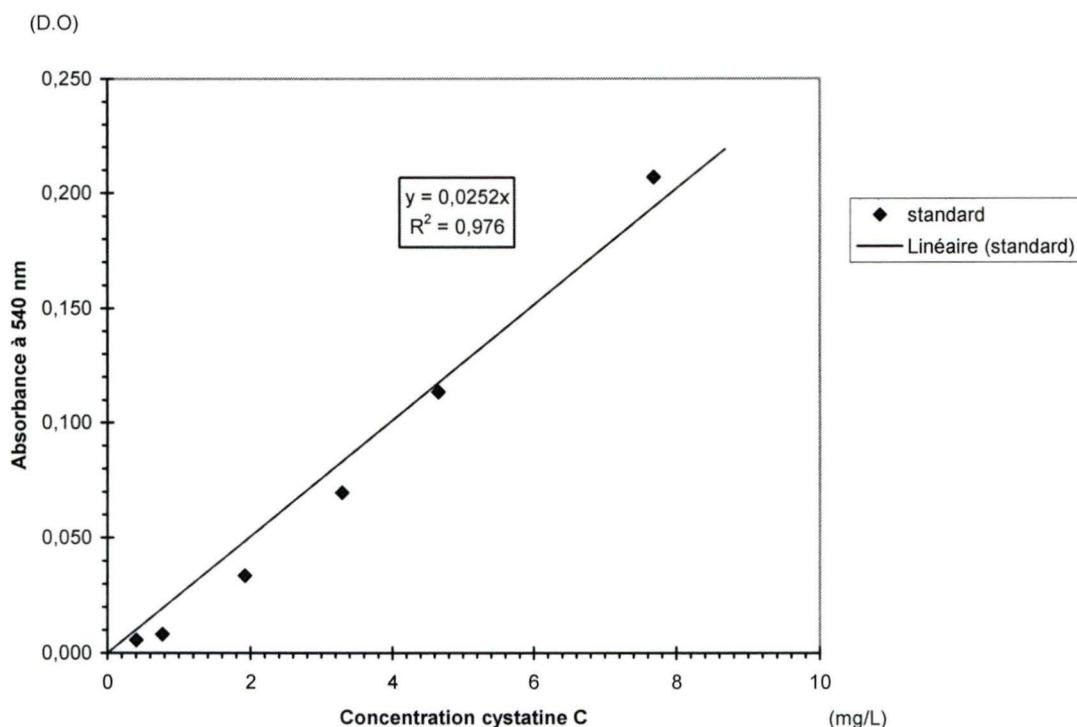
J'aimerais remercier Drs Jean Cusson et Daniel Lesiège pour leur supervision et intérêt pour ce projet, Jacques Lemaire PhD pour la réalisation des analyses statistiques ainsi que la Fondation Hôpital Charles LeMoyne pour leur soutien.

## *BIBLIOGRAPHIE*

1. Dharnidharka VR, Kwon C, Stevens G. (2002). Serum cystatin C is superior to serum creatinine as a marker of kidney function: a meta-analysis. *American Journal Kidney Disease* **40**: 221-226.
2. Perrone RD, Madias NE, Levey AS. (1992). Serum creatinine as an index of renal function: new insights into old concepts. *Clinical Chemistry* **38**: 1933-1953.
3. Massey D. (2004). Commentary: Clinical diagnostic use of cystatin C. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* **18**: 55-60.
4. Simonsen O, Grubb A, Thysell, H. (1985). The blood serum concentration of cystatin C (gamma-trace) as a measure of the glomerular filtration rate. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* **45**: 97-102.
5. Abrahamson M, Olsson I, Palsdottir A, Ulvsbäck M, Lundwall Å, Jensson O, Grubb A. (1990). Structure and expression of the human cystatin C gene. *Biochemistry Journal* **268**: 287-294.
6. Bode W, Engh R, Musil D, Thiele U, Huber R, Karshikov A, Brzin J, Kos J, Turk V. (1988). The 2.0 Å x-ray crystal structure of chicken egg white cystatin and its possible mode of interaction with cysteine proteinases. *EMBO Journal* **7**: 2593-2599.
7. Grubb A, Löfberg H. (1982). Human  $\gamma$ -trace, a basic microprotein: amino acid sequence and presence in the adenohypophysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **79**: 3024-3027.
8. Page MK, Bukki J, Luppa P, Neumeier D, (2000). Clinical value of cystatin C determination. *Clinica Chimica Acta* **297**: 67-72.
9. Price CP, and Finney, H. (2000) Developments in the assessment of glomerular filtration rate. *Clinica Chimica Acta* **297**: 55-66.
10. Rickli H, Benou K, Ammann P, Fehr Th, Brunner-La Rocca HP, Petridis H, Riesen W, Wuthrich RP. (2004). Time course of serial cystatin C levels in comparison with serum creatinine after application of radiocontrast media. *Clinical Nephrology* **61** (2): 98-102.
11. Blirup-Jensen S. (2001). Protein standardization III: Method optimization basic principles for quantitative determination of human serum proteins on automated instruments based on turbidimetry or nephelometry. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* **39** (11): 1098-1109.
12. Xu X, Zou J, Ding X, Xin D, Ren Y. (2004). Clinical value of serum cystatin C by ELISA for estimation of glomerular filtration rate. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* **18**: 61-64.

13. Bäck S-E, Ljungberg B, Nielsson-Ehle I, Borgä O, Nielsson-Ehle P. (1989). Age dependance of renal function: clearance of iohexol and p-amino hippurate in healthy males. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* **49**: 641-646.
14. Gökkusu CA, Ozden TA, Gul H, Yildiz, A. (2004). Relationship between plasma cystatin C and creatinine in chronic renal diseases and Tx-transplant sujets. *Clinical Biochemistry* **37**:94-97.
15. Schuck O, Teplan V, Sibova J, Stolova M. (2004). Predicting the glomerular filtration rate from serum creatinine, serum cystatin C and the Cockcroft and Gault formula with regard to drug dosage adjustement. *International journal of clinical pharmacology and therapeutics* **42** (2):93-97.
16. Xia LH, Bing XG, An XT. (2004). Serum cystatin C assay for the detection of early renal impairment in diabetic patients. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* **18**: 31-35.
17. Tepel M, Van der Giet M, Schwarzfeld C, Liermann D, Zidek W. (2000). Prevention of radiographic-contrast-agent-induced reductions in renal function by acetylcysteine. *The New England Journal of Medicine* **343** (3): 180-184.

## Annexe 1



**Figure 1 : Courbe standard du dosage de la protéine cystatine C .** La courbe standard a été effectuée à l'aide de six standards de concentrations différentes de cystatine C humaine produite par *Escherichia coli*, soient : 0.404 mg/L, 0.768 mg/L, 1.92 mg/L, 3.29 mg/L, 4.65 mg/L et 7.68 mg/L. La calibration du multianalyseur (Olympus AU 640) a été réalisée suite à la lecture des densités optiques, à une longueur d'onde de 540 nm, de chacun de ces standards. Après la calibration du multianalyseur, deux solutions de contrôle contenant toujours de la cystatine C humaine produite par *E.Coli* ont été analysées avec des concentrations initiales de 4.82 mg/L (C1) (intervalles de références : 4.10 à 5.54 mg/L) et de 1.38 mg/L (C2) (intervalles de références : 1.17 à 1.59 mg/L). Trois échantillons de chacun de ces contrôles ont été analysés, soit un avant chaque dosage, avec une concentration moyenne de cystatine C de 4.568 mg/L (écart-type moyen de 0.0439 mg/L et de coefficient de variation de 0.962%) pour le contrôle C1. Pour le contrôle C2, la moyenne de la concentration des trois échantillons de cystatine C est de 1.366 mg/L (écart-type de 0.0279 mg/L et de coefficient de variation de 2.04%).



Tableau I : Évaluation de la précision de la pCys C et de la pCr chez six volontaires sains.

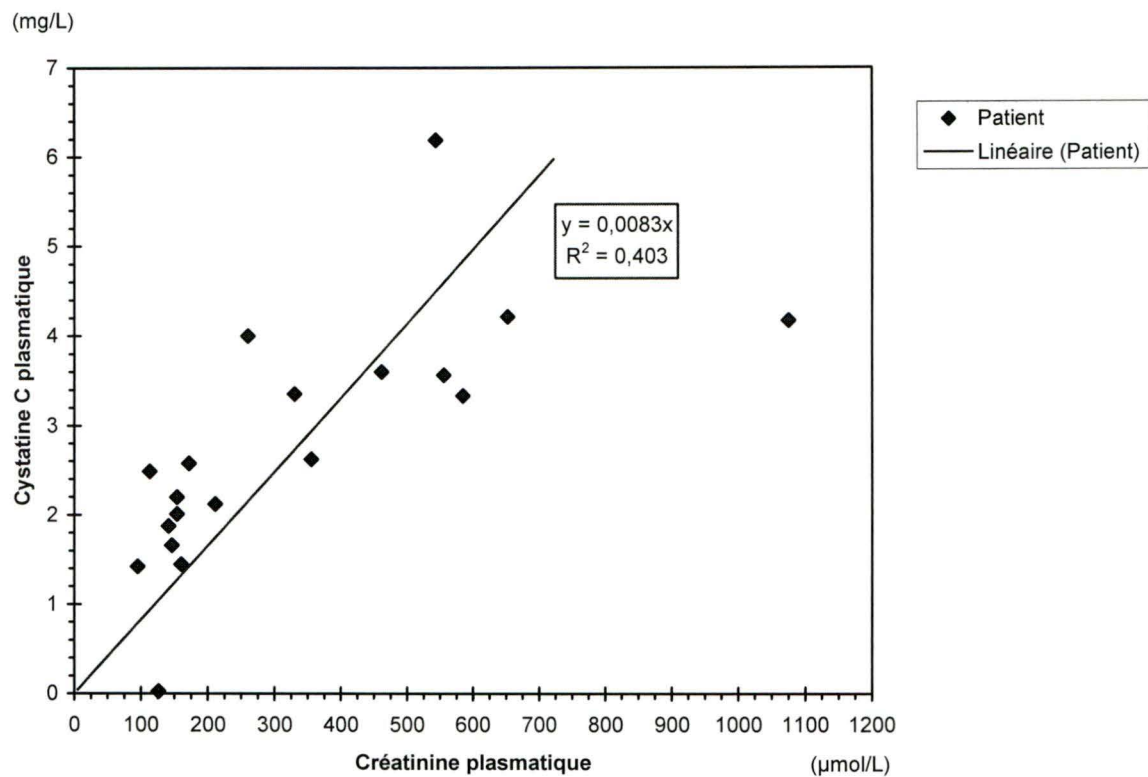
Sexe sujet	Âge (ans)	Poids (kg)	Taille (m)	Indice de masse corporelle (IMC) (kg/m <sup>2</sup> )	Temps (h)	pCr (μmol/L)	Moyenne pCr (μmol/L)	Clairance créatinine calculée (mL/min)	pCys C					Jour 1 à 3			
														pCys C		pCr	
									Duplicata (mg/L)	Moyenne (mg/L)	Écart-type inter-essai (mg/L)	CV inter-essai (%)		Écart-type moyen (mg/L)	CV (%)	Écart-type moyen (μmol/L)	CV (%)
H	22	65,8	1,80	20,3	0	84	84	116	1,077	1,068	1,073	0,00636	0,593	0,0708	6,15	1,00	1,19
					24	85			1,163	1,172	1,168	0,00636	0,545				
					48	83			1,213	1,209	1,211	0,00283	0,234				
H	22	59,0	1,70	20,4	0	96	96	90,7	0,923	0,927	0,925	0,00283	0,306	0,0183	1,97	4,00	4,17
					24	92			0,909	0,900	0,905	0,00636	0,704				
					48	100			0,959	0,923	0,941	0,0255	2,71				
H	48	67,0	1,65	24,6	0	77	82	100	0,827	0,832	0,830	0,00354	0,426	0,0202	2,41	10,1	12,3
					24	76			0,832	0,823	0,828	0,00636	0,769				
					48	94			0,873	0,854	0,864	0,0134	1,56				
F	43	49,0	1,73	16,4	0	64	65	79,0	0,791	0,813	0,802	0,0156	1,94	0,0404	4,82	0,577	0,893
					24	65			0,832	0,832	0,832	0,000	0,000				
					48	65			0,882	0,882	0,882	0,000	0,000				
F	55	57,7	1,55	24,0	0	72	74	72,3	0,859	0,854	0,857	0,00354	0,413	0,0116	1,33	2,52	3,39
					24	77			0,873	0,859	0,866	0,00990	1,14				
					48	74			0,877	0,882	0,880	0,00354	0,402				
H	26	86,3	1,88	24,4	0	89	86	138	0,868	0,895	0,882	0,0191	2,17	0,0162	1,88	4,16	4,86
					24	81			0,854	0,845	0,850	0,00636	0,749				
					48	87			0,863	0,859	0,861	0,00283	0,329				

Les concentrations en protéines créatinine sont déterminées de la même façon dans tous les centres hospitaliers. Alors que la détermination des concentrations en protéines cystatine C a été déterminée par une nouvelle méthode de dosage (voir méthodologie analytique dans matériels et méthodes, p.8). Les sujets sains sont composés de 4 hommes et 2 femmes, âgés entre 22 et 55 ans. Le poids, l'âge et le sexe ont été demandé afin d'évaluer leur bon fonctionnement rénal par le calcul de la clairance de la créatinine (formule de Cockcroft et Gault<sup>3</sup>). Les prélèvements sanguins ont été fait pour tous les volontaires sains sur l'heure du midi avant d'avoir manger. Toutefois, aucune restriction a été apportée quant à l'hydratation. Le coefficient de variation (cv) est le paramètre qui a été évalué par l'analyse statistique et qui permet de déterminer les variations des méthodes analytiques de dosages de pCr et de pCys C. Les cv sont les mêmes pour la pCr et la pCys C inter-sujets et intra-sujet, soient respectivement de 2% et 5%.

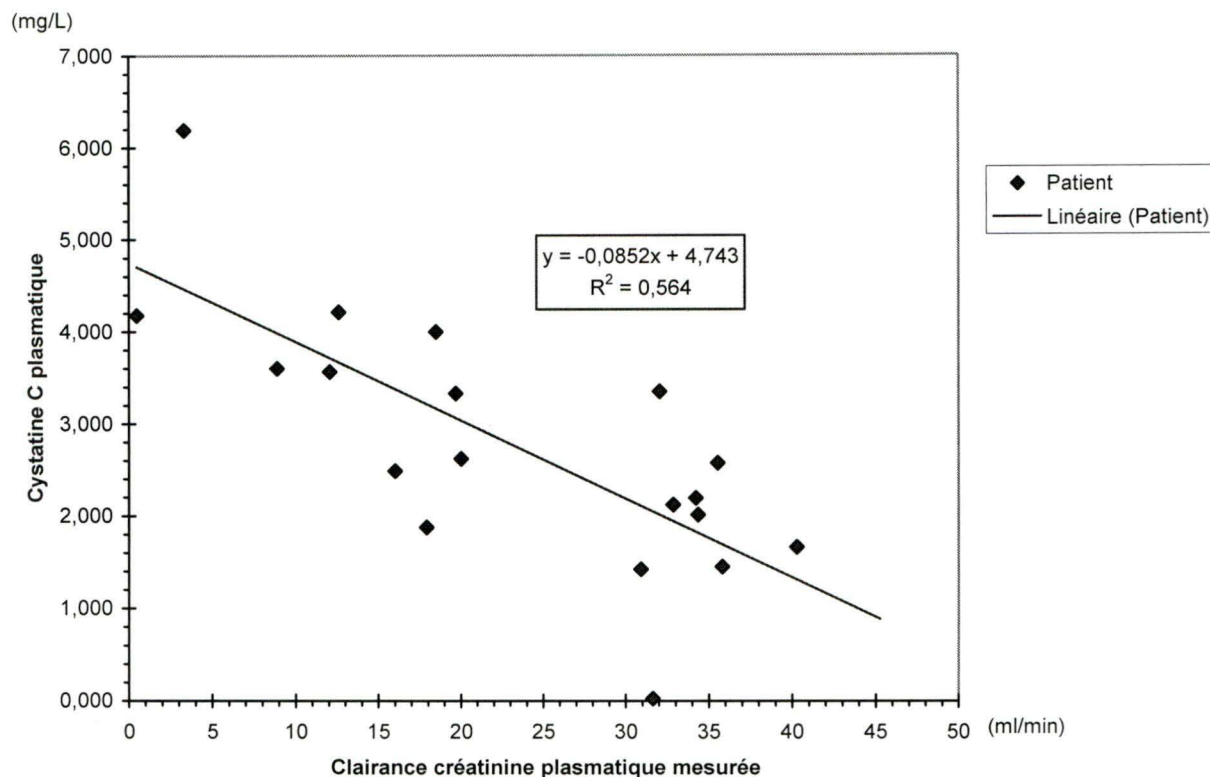
Tableau II : Impact de certains paramètres anthropomorphiques sur les corrélations entre pCysC et les deux marqueurs conventionnels pCr et ClCrM chez dix-neuf sujets ayant une ClCrM inférieure à 50 mL/min, selon l'analyse de covariance. Les valeurs de F et p (entre parenthèses) sont illustrées.

Corrélations	Âge	Sexe	Poids	Taille	IMC
pCys C vs pCr	1,8 (0,19)	1,5 (0,23)	0,18 (0,68)	0,30 (0,59)	0,64 (0,43)
pCys C vs ClCrM	1,2 (0,29)	0,3 (0,60)	4,4 (0,06)	1,0 (0,33)	1,7 (0,22)

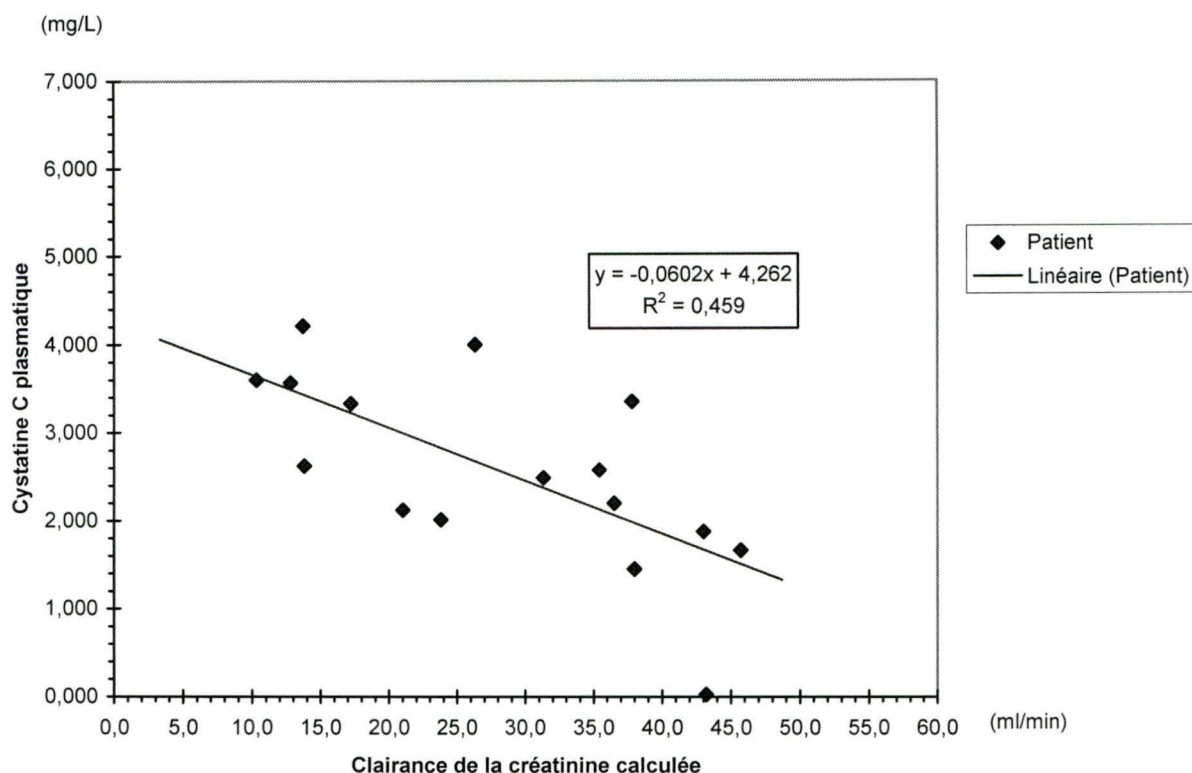
## Annexe 2



**Figure 1 : Détermination de la corrélation entre la concentration de protéines cystatine C et celle de la créatinine.** Le dosage de la cystatine C (voir méthodologie analytique dans Matériels et Méthodes, p.150) a été effectué sur 19 sujets ayant une récente clairance de créatinine inférieure à 50mL/min. Le coefficient de Pearson (racine carré de  $r^2$ ) permet de déterminer la relation entre la concentration de protéine cystatine C et la créatinine plasmatique, qui est égale à 0.635.



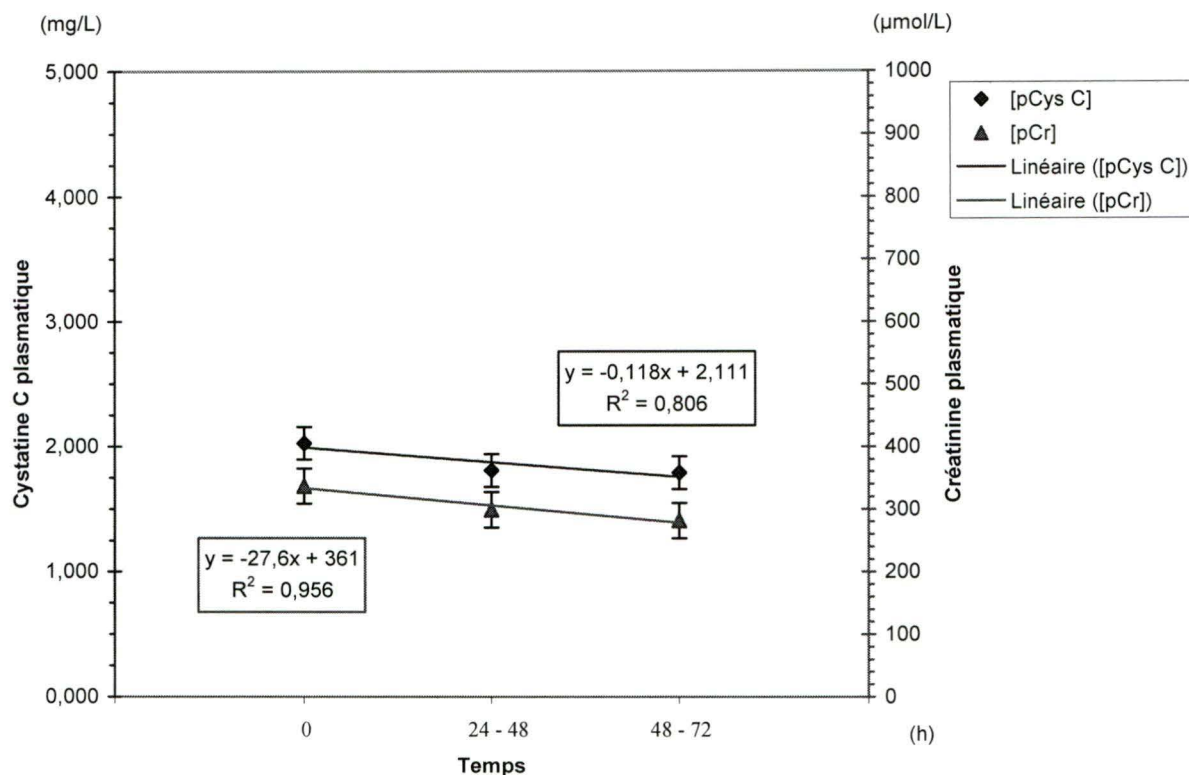
**Figure 2 : Détermination de la corrélation entre la concentration de protéines cystatine C et la clairance de la créatinine mesurée (ClCrM).** Le dosage de la cystatine C (voir méthodologie analytique dans Matériels et Méthodes, p.150) a été effectué sur 19 sujets ayant une récente clairance de créatinine inférieure à 50mL/min. La clairance de créatinine plasmatique mesurée a été déterminée par l'équation  $ClCrM = (U \times V) / P$ , où (U) représente la concentration urinaire de créatinine plasmatique, (V) le volume d'urine excrétée en 24 heures et (P) la concentration plasmatique en créatinine. Le coefficient de Pearson (racine carré de  $r^2$ ) permet de déterminer la relation entre la concentration de protéine cystatine C et la ClCrM pendant 24heures, qui est égale à 0.751.



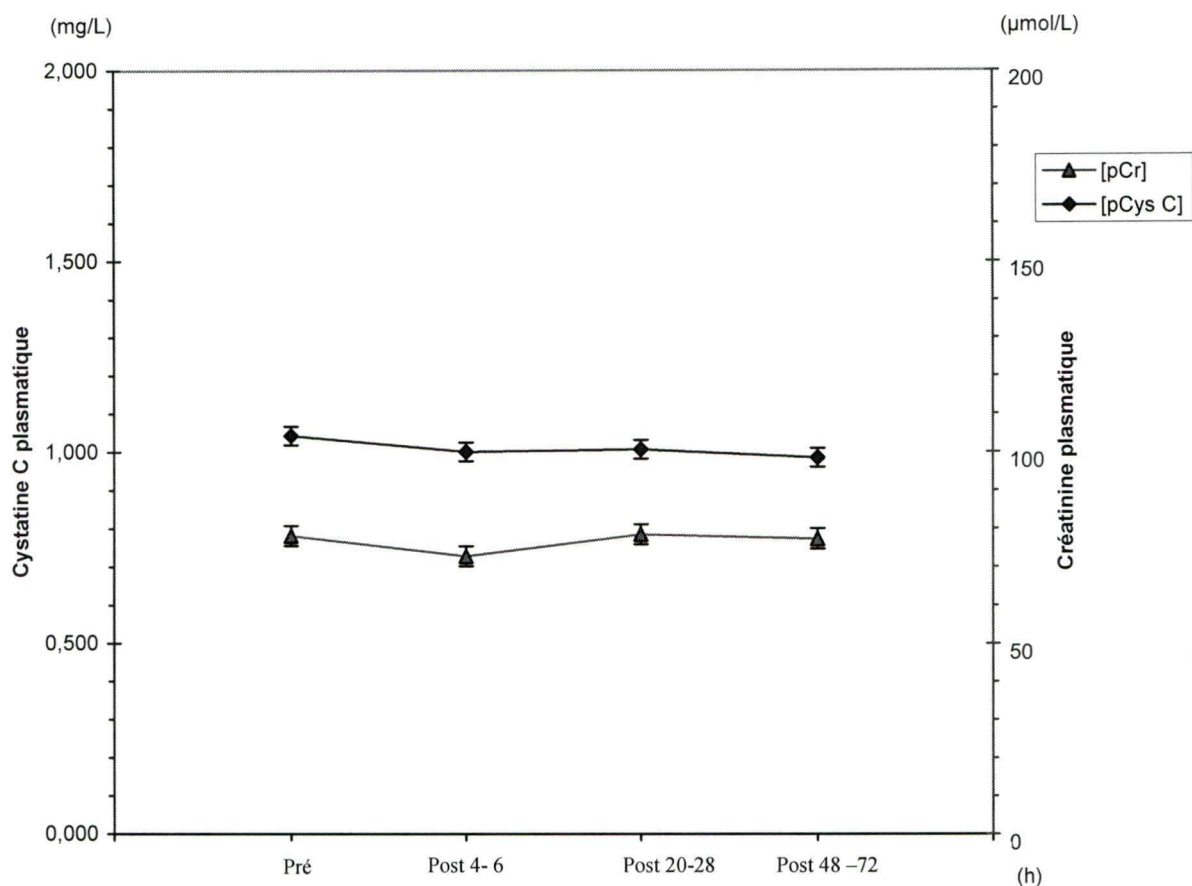
**Figure 3 : Détermination de la corrélation entre la concentration de protéines cystatine C et la clairance de la créatinine calculée (ClCrC).** Le dosage de la cystatine C (voir méthodologie analytique dans Matériels et Méthodes, p.150) a été effectué sur 19 sujets ayant une récente clairance de créatinine inférieure à 50 mL/min. La ClCrC a été déterminée par la formule de Cockcroft et Gault.<sup>3</sup> Le coefficient de Pearson (racine carrée de  $r^2$ ) permet de déterminer la relation entre la concentration de protéine cystatine C et la ClCrC, qui est égale à 0.677.



### Annexe 3



**Figure 1 : Validation de la performance de la mesure de la pCys C comme marqueur de la fonction rénale à court terme.** Cinq sujets porteurs d'un diagnostic d'insuffisance rénale aiguë et chez qui une réhydratation ou la levée d'une obstruction a provoqué une amélioration prévisible de la fonction rénale. La pCr ainsi que la pCys C ont été mesurées (voir méthodologie analytique dans Matériels et Méthodes, p.150) de façon sériées à trois reprises à des intervalles de 1-2 jours (24-48h) entre les prises. La réduction linéaire de pCr est suivie par celle de la pCys C. Chaque point représente la moyenne des concentrations des cinq sujets pour chacune des protéines.



**Figure 2 : Validation de la performance de la mesure de la pCys C comme marqueur de la fonction rénale à court terme chez des sujets ayant subi un examen d'imagerie avec exposition aux substances de contrastes iodées.** Six sujets connus pour une clairance estimée de la créatinine (formule de Cockcroft et Gault<sup>3</sup>) de moins de 50 mL/min ont subi un examen d'imagerie (angiographie/angioplastie ou tomodensitométrie) demandant une exposition aux substances de contrastes. Chacun des sujets a reçu une quantité indéterminée de produit de contraste avec ou sans prise de N-acétylcystéine (médicament rénoprotecteur).<sup>17</sup> Les mesures de pCr et de pCys C ont été effectuées (voir méthodologie analytique dans matériels et méthodes, p.150) avant l'examen d'imagerie. Alors que trois dosages de pCys C et de pCr ont été réalisés post-imagerie, soient après 4 à 6 heures, 20 à 28 heures et 48 à 72 heures. On remarque les changements assez parallèles des deux variables à l'étude. Chaque point représente la moyenne des concentrations des six sujets pour chacune des protéines.

## **ANNEXE B**

### **PROTOCOLE DES SOLUTIONS TAMPON POUR L'ÉLECTROPHORÈSE CAPILLAIRE**



## PRÉPARATION SOLUTIONS TAMPONS POUR EC

**Tampon borate** 220 mmol/L, pH 8,8 dissout dans du NaOH 2,5 mol/L (Shihabi et Constantinescu, 1992; Jenkins *et al.*, 2000); protéger de la lumière et garder à 4°C:

**Solution  $\text{H}_3\text{BO}_3$  220 mmol/L**, (PM : 61,8 g/mol) :

- 1- Mettre 1,3596 g de borate dans un ballon jaugé de 100 mL;
- 2- Dissoudre dans de l'eau nanopure et compléter jusqu'à 100 mL.

**Solution NaOH 2,5 mol/L:**

- 1- Faire une dilution, dans 100 mL, de la solution stock NaOH 10 M, de manière à obtenir une solution diluée de 2.5 mol/L.
- 2- Mettre 25 mL de 10 N NaOH dans un ballon jaugé de 100 mL;
- 3- Dissoudre dans de l'eau nanopure et compléter jusqu'à 100 mL.

**Solution tampon borate 220 mmol/L, pH 8,8,  
pKa initiale = 9,23:**

Mélanger la solution  $\text{H}_3\text{BO}_3$  à la solution NaOH de manière à obtenir un pH de 8,8. Vérifier avec un pHmètre.

**Tampon phosphate** 6 mmol/L à pH 7,4 (Shihabi et Constantinescu, 1992; Jenkins *et al.*, 2000); protéger de la lumière et garder à 4°C :

**Solution  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$** , (PM : 120 g/mol) :

- 1- Mettre 0,72 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  dans un ballon jaugé de 1000 mL;
- 2- Dissoudre dans de l'eau nanopure et compléter jusqu'à 1000 mL.

**Solution  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$** , (PM : 141,96 g/mol) :

- 1- Mettre 0,8518g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  dans un ballon jaugé de 1000 mL;
- 2- Dissoudre dans de l'eau nanopure et compléter jusqu'à 1000 mL.

**Tampon de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  /  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  à 6 mmol/L, pH 7,4:**

Mélanger la solution  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  à la solution  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  de manière à obtenir un pH de 7,4. Vérifier avec un pHmètre.

## **ANNEXE C**

### **PROTOCOLE DE LA SOLUTION MÈRE D'IOHEXOL ET DE LA COURBE STANDARD IOHEXOL**

## PRÉPARATION DE LA COURBE STANDARD IOHEXOL

**Refaire les compositions à tous les 2 mois :**

- 1- Effectuer une solution de 50 mL stock d'iohexol de 8 g/L, elle est diluée ds 6 mmol/L de tampon phosphate à pH 7.4 contenant 60 g/L d'albumine bovine et 0,145 mol/L de NaCl (Shihabi et Constantinescu, 1992; Jenkins *et al.*, 2000) (on utilise à la place : 0,154 mol/L de NaCl à 0,9 s, poche de soluté HCLM);

- 1a- Prendre environ 25 mL tampon phosphate;
- 1b- Ajouter 1,948 mL de NaCl 0,154 mol/L (ou 9,0 g/L);
- 1c- Ajouter 3 g d'albumine bovine de 60 g/L;
- 1d- Compléter jusqu'à 50 mL avec du tampon phosphate

- 2- Mettre 0,4 g d'iohexol (histodenz, sigma) dans un ballon jaugée de 50 mL;

- 3- Dissoudre avec le tampon phosphate contenant l'albumine bovine et NaCl et compléter jusqu'à 50 mL:

Quantité d'iohexol (Histodenz)	Volume de tampon phosphate 6 mmol/L à pH 7,4 contenant albumine bovine et NaCl	Volume total (mL)
0,4 g (ou 400 mg)	environ 50 mL	50

Exemples de calcul :

pour le volume NaCl 154 mmol/L:  $154 \text{ mmol/L} * V = 6 \text{ mmol/L tampon P} * 0,05 \text{ L}$   
 tampon pour le volume albumine de 60 g/L: 60 g ds 1000mL alors dans 50 mL = 3g

- 4- Aliquoter la solution std iohexol sous forme d'aliquot de 1 mL et congeler à  $-70^{\circ}\text{C}$  (conserver pendant 2 mois au maximum);
- 5- **Courbe standard** effectuée avec du plasma sans iohexol (prendre toujours le même pool de plasma), préparer d'avance 4 courbes standards (à conserver pendant 2 mois au maximum à  $-70^{\circ}\text{C}$ ) :

Concentration iohexol (mg/L)	Volume plasma ( $\mu\text{L}$ )	Volume sln stock iohexol 8 g/L ( $\mu\text{L}$ )	Volume total (mL)
20	997,5	2,5	1
40	995	5	1
80	990	10	1
160	980	20	1

Exemple de calcul:  $C1 * V1 = C2 * V2 : 8 \text{ mg/mL} * \text{vol.iohexol} = 0,02 \text{ mg/mL} * 1 \text{ mL}$

## **ANNEXE D**

### **PROTOCOLE DE LA SOLUTION MÈRE IODIXANOL ET DE LA COURBE STANDARD IODIXANOL**

## **PRÉPARATION DE LA COURBE STANDARD IODIXANOL :**

### **Refaire les compositions à tous les 2 mois :**

- 1- Effectuer une solution de 50 mL stock d'iodixanol de 8 g/L, elle est diluée ds 6 mmol/L de tampon phosphate à pH 7,4 contenant 60 g/L d'albumine bovine et 0,154 mol/L de NaCl;

- 1a- Prendre environ 25 mL tampon phosphate;
- 1b- Ajouter 1,948 mL de NaCl 0,154mol/L (ou 9,0g/L);
- 1c- Ajouter 3 g d'albumine bovine de 60 g/L;
- 1d- Compléter jusqu'à 50 mL avec du tampon phosphate

- 2- Mettre 667 µL d'iodixanol (Opti prep, sigma) dans un ballon jaugée de 50 mL;

Attention : Opti prep (sigma) est concentré à seulement 60 g/100 mL d'eau

Calcul : quantité iodixanol :  $600 \text{ g/L} * V = 8 \text{ g/L} * 50 \text{ mL}$

- 3- Mélanger dans le tampon phosphate contenant de l'albumine bovine et NaCl et compléter jusqu'à 50 mL:

Quantité d'iodixanol (Opti prep)	Volume de tampon phosphate 6 mmol/L à pH 7,4 contenant albumine bovine et NaCl	Volume total (mL)
667µL	reste	50

- 4- Aliquoter la solution std iodixanol sous forme d'aliquot de 1 mL et congeler à -70°C (conserver pendant 2 mois au maximum);
- 5- Courbe standard effectuée avec du plasma sans iodixanol (prendre toujours le même pool de plasma), préparer d'avance 4 courbes standards (à conserver pendant 2 mois au maximum à -70°C) :

Concentration iodixanol (mg/L)	Volume plasma (µL)	Volume sln stock iodixanol 8 g/L (µL)	Volume total (mL)
20	997,5	2,5	1
40	995	5	1
80	990	10	1
160	980	20	1

## **ANNEXE E**

### **PROTOCOLE SOLUTION MÈRE IOHEXOL-IODIXANOL ET DE LA COURBE STANDARD IOHEXOL-IODIXANOL**



## PRÉPARATION DE LA COURBE STANDARD IOHEXOL-IODIXANOL

### **Refaire les compositions à tous les 2 mois:**

- 1- Effectuer une solution de 50 mL stock d'iohexol-iodixanol de 8 g/L, elle est diluée ds 6 mmol/L de tampon phosphate à pH 7,4 contenant 60 g/L d'albumine bovine et 0,154 mol/L de NaCl;

- 1a- Prendre environ 25 mL tampon phosphate;
- 1b- Ajouter 1,948 mL de NaCl 0,154 mol/L (ou 9,0 g/L);
- 1c- Ajouter 3 g d'albumine bovine de 60 g/L;
- 1d- Compléter jusqu'à 50 mL avec du tampon phosphate.

- 2- Mettre 667µL d'iohexol-iodixanol dans un ballon jaugée de 50 mL :

*Attention : Les sujets reçoivent 5 mL iohexol et environ 95 mL d'iodixanol.*

Alors, pour un total de 100 mL :

- |  |                  |
|--|------------------|
| <ul style="list-style-type: none"><li>▪ 3 g d'iohexol: Histodenz (équivalent à 5 mL)</li><li>▪ 57g d'iodixanol: Opti prep (équivalent à 95 mL)</li></ul> | 60 g/100mL d'eau |
|--|------------------|

puisque iodixanol : Opti prep est concentré à seulement 60 g/100mL d'eau alors on complète le volume jusqu'à 100 mL avec de l'eau.

Calcul : quantité iohexol-iodixanol :  $600 \text{ g/L} * V = 8 \text{ g/L} * 50 \text{ mL}$

- 3- Dissoudre avec le tampon phosphate contenant l'albumine bovine et NaCl et compléter jusqu'à 50 mL:

Quantité iohexol-iodixanol	Volume de tampon phosphate 6 mmol/L à pH 7,4 contenant albumine bovine et NaCl	Volume total (mL)
667µL	reste	50

- 4- Aliquoter la solution std iohexol-iodixanol sous forme d'aliquot de 1 mL et congeler à  $-70^{\circ}\text{C}$  (conserver pendant 2 mois au maximum);
- 5- Courbe standard effectuée avec du plasma sans iohexol-iodixanol (prendre toujours le même pool de plasma), préparer d'avance 4 courbes standards (à conserver pendant 2 mois au maximum à  $-70^{\circ}\text{C}$ ) :

Concentration iohexol-iodixanol (mg/L)	Volume plasma ( $\mu$ L)	Volume sln stock iohexol-iodixanol 8g/L ( $\mu$ L)	Volume total (mL)
20	997,5	2,5	1
40	995	5	1
80	990	10	1
160	980	20	1



**ANNEXE F**  
**PROTOCOLE DES ÉCHANTILLONS DE CONTRÔLE IOHEXOL**

## PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS CONTRÔLES D'IOHEXOL :

Refaire à tous les 2 mois :

Si les contrôles varient de  $\pm 2$  unités de mesures, on ne recalibre pas le CE (Shihabi et Constantinescu, 1992; Jenkins *et al.*, 2000).

1-si 1mL omnipaque 300 (647 mg iohexol/mL) = 1,278 g

2-alors pour une concentration de 160 mg/L d'iohexol = 0,316 g d'omnipaque;

3-Faire 10 mL de la solution de 160 mg/L d'**iohexol** :

Concentration iohexol (mg/L)	Volume d'iohexol de 647 mg/mL ( $\mu$ L)	Volume plasma (mL)	Volume total (mL)
160	2,47	9,99753	10

4-Conserver à 4°C la solution de 160 mg/L d'iohexol (pendant 2 mois au maximum) et protéger de la lumière;

5-préparation des **autres contrôles**, préparer d'avance 4 séries de contrôles (toujours avec le même pool de plasma) et les conserver à 4°C (pendant 2 mois au maximum):

Concentration iohexol (mg/L)	Volume sln iohexol 160 mg/L ( $\mu$ L)	Volume plasma ( $\mu$ L)	Volume total (mL)
20	125	875	1
40	250	750	1
80	500	500	1

N.B. : volume sln iohexol :  $160 \text{ mg/L} * V = 20 \text{ mg/L} * 1 \text{ mL} : V = 0,125 \text{ mL}$  ou 125  $\mu$ L

## **ANNEXE G**

### **PROTOCOLE DES ÉCHANTILLONS DE CONTRÔLE D'IODIXANOL**

## PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS CONTRÔLES D'IODIXANOL

**Refaire à tous les 2 mois :**

Si les contrôles varient de  $\pm 2$  unités de mesures, on ne recalibre pas le CE.

- 1- Faire 10 mL de la solution de 160 mg/L d'iodixanol :  
(visipaque 320, 652 mg iodixanol/mL)

Concentration iodixanol (mg/L)	Volume d'iodixanol de 652 mg/mL ( $\mu$ L)	Volume plasma (mL)	Volume total (mL)
160	2,45	9,99755	10

- 2- Conserver à 4°C la solution de 160 mg/L d'iodixanol (pendant 2 mois au maximum) et protéger de la lumière;
- 3- Préparation des autres contrôles, préparer d'avance 4 séries de contrôles (toujours le même pool de plasma) et les conserver à 4°C (pendant 2 mois au maximum):

Concentration iodixanol (mg/L)	Volume sln iodixanol 160 mg/L ( $\mu$ L)	Volume plasma ( $\mu$ L)	Volume total (mL)
20	125	875	1
40	250	750	1
80	500	500	1

## **ANNEXE H**

### **PROTOCOLE DES ÉCHANTILLONS DE CONTRÔLE D'IOHEXOL-IODIXANOL**

## PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS CONTRÔLES IOHEXOL-IODIXANOL

**Refaire à tous les 2 mois :**

Si les contrôles varient de  $\pm 2$  unités de mesures, on ne recalibre pas le CE.

1- Faire 10 mL de la solution de 160 mg/L d'iohexol-iodixanol :

1a- Faire le mélange iohexol-iodixanol :

Prendre 5 mL d'Omnipaque 300 et le mélanger à 95 mL de Visipaque 320 :

Concentration iohexol-iodixanol (mg/L)	Volume mélange iohexol-iodixanol 651,75mg/mL (µL)	Volume plasma (mL)	Volume total (mL)
160	2,45	9,99755	10

Ex calcul moyenne concentration mélange iohexol-iodixanol :

$$\frac{(5 \text{ mL} * 647 \text{ mg/mL}) + (95 \text{ mL} * 652 \text{ mg/mL})}{100 \text{ mL}} = 651,75 \text{ mg/mL}$$

2- Conserver à 4°C la solution de 160 mg/L d'iohexol-iodixanol (pendant 2 mois au maximum) et protéger de la lumière;

2- Préparation des autres contrôles, préparer d'avance 4 séries de contrôles (toujours le même pool de plasma) et les conserver à 4°C (pendant 2 mois au maximum):

Concentration iohexol-iodixanol (mg/L)	Volume sln iohexol-iodixanol 160 mg/L (µL)	Volume plasma (µL)	Volume total (mL)
20	125	875	1
40	250	750	1
80	500	500	1

**ANNEXE I**

**FORMULAIRES DE CONSENTEMENT  
VERSION FRANÇAISE ET ANGLAISE**

## FORMULAIRE DE CONSENTEMENT

**N° DE PROJET :** 2004-05-66

**TITRE DU PROJET :** Clairance d'iohexol chez les sujets recevant une combinaison de substance de contraste iohexol-iodixanol.

**PROTOCOLE :** N/A

**COMMANDITAIRE :** N/A

**CHERCHEUR PRINCIPAL :** Dr Jean Cusson

**ADRESSE :** Hôpital Charles LeMoyne  
3120, boul. Taschereau  
Greenfield Park (Québec) J4V 2H1

**TÉLÉPHONE :** (450) 466-5000, poste 3106 (Dr. Jean Cusson)  
(514) 925-5969 téléavertisseur code abrégé 700  
(Marie-Claude Denis)

---

### DESCRIPTION GÉNÉRALE DU PROJET

On vous demande de participer à un projet de recherche portant sur la mesure de la « clairance de l'iohexol », mesure faite à l'aide de prises de sang. L'iohexol et l'iodixanol sont des substances de contraste utilisées régulièrement par la radiologie lors d'examens diagnostiques.

Des publications scientifiques récentes suggèrent que la mesure de la « clairance de l'iohexol » serait un meilleur reflet de la fonction rénale que la mesure de la clairance de créatinine, test utilisé couramment mais qui varie avec de nombreux facteurs dont l'âge, le poids etc.

Nous croyons que l'utilisation de la combinaison des deux substances de contrastes, environ 10% d'iohexol et 90% d'iodixanol plutôt que 100% d'iodixanol permettrait de réaliser sécuritairement les examens d'imagerie avec contraste (comme une angiographie) tout en suivant de près la fonction rénale. Cependant, nous devons vérifier la faisabilité de cette approche novatrice et ce projet vous est donc soumis puisque nous recrutons des sujets devant avoir une angiographie.

Environ 20 sujets seront invités à participer à ce projet de recherche.



La participation à l'étude est offerte à deux groupes de sujets différents dont vous pouvez faire partie :

1. Vous devez subir un examen radiologique (angiographie abdominale et/ou des membres inférieurs) avec injection de substance de contraste à la demande de vos médecins et votre fonction rénale est normale.
2. Vous devez subir un examen radiologique (angiographie abdominale et/ou des membres inférieurs) avec injection de substance de contraste à la demande de vos médecins mais votre fonction rénale est diminuée.

## **NATURE DE LA PARTICIPATION**

Dans chacune de ces 2 circonstances ci-haut mentionnées, un prélèvement pour la mesure de la créatinine plasmatique doit normalement être fait, et parfois en série pendant quelques jours pour suivre l'évolution.

Nous ajouterons 6 prélèvements de chacun de 10 mL (2 cuillères à thé) pour la mesure de la clairance de l'iohexol, après 1, 2, 3, 4, 8 et 24 heures de l'angiographie. En plus d'un prélèvement juste avant l'angiographie.

De plus, 13 mL de sang seront aussi prélevés 4h après l'angiographie pour mesurer la cystatine C et la créatinine afin de mieux connaître votre fonction rénale. La créatinine est un test de routine mais la cystatine C est un test plus récent toujours en évaluation.

Pour les deux groupes de sujets déterminés plus haut, on prélèvera donc au total 83 mL de sang de plus que ce qui aurait été prélevé habituellement sans le projet.

Ainsi, vous aurez un prélèvement sanguin avant l'examen et 6 autres après l'angiographie. Tous les prélèvements seront faits à l'intérieur de 24 heures et on se sert d'un petit cathéter à prélèvement qu'on laisse en place lorsque c'est possible pour réduire le nombre de ponction veineuse au minimum.

## **RISQUES ET INCONVÉNIENTS**

Il est improbable que ces prélèvements additionnels vous causent un quelconque inconfort. Autant que possible, nous combinerons ces prélèvements avec ceux déjà prévus par votre médecin.

Il est connu que l'iohexol et l'iodixanol comportent des risques d'allergies graves. Si vous êtes allergique à l'iode, vous ne pouvez participer à cette étude.

## **AVANTAGES**

Ce projet ne vous apportera pas d'avantages du moins à court terme à cause de sa nature exploratoire.

## **CONFIDENTIALITÉ**

Toute information personnelle recueillie dans le cadre de ce projet sera gardée confidentielle. Sauf pour des fins de vérifications et de gestion externes, son accès sera restreint aux seules personnes de l'équipe de recherche pour qui cela est indispensable à leur travail. Nous vous attribuerons un numéro de code, ce qui fait que vous ne serez pas identifié(e) par votre nom. La clé reliant les noms des participants à leur code est conservée à l'Hôpital Charles LeMoyne. En aucun cas, votre nom ou autre information pouvant vous identifier ne sera utilisé dans les publications des résultats de cette recherche ou pour des activités commerciales.

Vous devez savoir qu'en signant le présent consentement, vous autorisez le chercheur à fournir vos coordonnées au Service des archives médicales de l'Hôpital Charles LeMoyne afin que soit constitué un registre institutionnel pouvant identifier tous les sujets de l'Institution ayant participé aux différents projets de recherche qui s'y tiennent.

Ce registre s'inscrit parmi les mesures établies pour votre protection, tel que prescrit par le Ministère de la Santé et des Services sociaux, permettant à l'hôpital de vous contacter le cas échéant. Aucune information recueillie ne servira la recherche et celle-ci sera détruite au plus tard douze (12) mois suivant la fin de votre participation à ce projet.

## **COMPENSATION ET CLAUSE DE RESPONSABILITÉ**

Toutefois, en signant ce formulaire de consentement, vous ne renoncez à aucun de vos droits. De plus, vous ne libérez ni les chercheurs ni le promoteur de leurs responsabilités légales et professionnelles dans l'éventualité où une situation vous causerait préjudice.

## **PERSONNES RESSOURCES**

Si vous désirez de plus amples renseignements au sujet du déroulement de ce projet ou si vous souhaitez vous retirer du projet en cours de route, ou pour effectuer un changement d'adresse, vous pouvez communiquer avec Dr Jean Cusson ou les infirmières de recherche soit Suzie Roy ou Brigitte Lecours au (450) 466-5000 poste 3106 ou Marie-Claude Denis téléavertisseur (514) 925-5969 code abrégé 700.

Le projet de recherche et le formulaire de consentement ont été approuvés par le comité d'éthique de la recherche de l'Hôpital Charles LeMoyne.

Si vous désirez des renseignements supplémentaires concernant vos droits en tant que sujet participant à une étude de recherche ou en cas de dommage attribuable à la recherche, c'est-à-dire s'il y a des effets secondaires nocifs pour votre santé, vous pouvez également communiquer avec le secrétariat du Comité d'éthique de la recherche de l'Hôpital Charles LeMoyne au 450-466-5000 poste 2564.

## **PARTICIPATION VOLONTAIRE**

Vous êtes libre de participer à ce projet ou de vous en retirer en tout temps sur simple avis verbal, sans préjudice. Un retrait en cours de route entraîne la destruction des renseignements et matériel biologique recueillis de la personne ayant fait la demande. Il est possible que vous soyez retiré de l'étude par les chercheurs, sans votre consentement, à n'importe quel moment.

## ÉNONCÉ DU CONSENTEMENT

Dr. \_\_\_\_\_ m'a expliqué la nature et le déroulement du projet de recherche. J'ai lu et compris le présent formulaire de consentement. J'ai eu l'occasion de poser des questions au sujet de cette étude et on y a répondu à ma satisfaction. Je comprends que je demeure libre de me retirer de cette étude en tout temps, sur simple avis verbal, sans que cela n'affecte en aucune façon les soins dont je pourrais bénéficier dans l'avenir, le cas échéant. Je certifie qu'on m'a laissé le temps voulu pour prendre ma décision.

Après réflexion, j'accepte de participer à ce projet de recherche. Je recevrai une copie de ce formulaire de consentement et l'original sera déposé dans mon dossier médical.

\_\_\_\_\_  
Nom du sujet (lettres moulées)

\_\_\_\_\_  
Signature du sujet

Date : \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_  
jour mois année

\_\_\_\_\_  
Nom du témoin (lettres moulées)

\_\_\_\_\_  
Signature du témoin

Date : \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_  
jour mois année

## ENGAGEMENT DU CHERCHEUR

Le projet de recherche a été décrit et expliqué au participant ainsi que les modalités de sa participation. Un membre de l'équipe de recherche a répondu à ses questions et lui a expliqué que la participation est libre et volontaire et qu'il pouvait y mettre un terme à tout moment. Le participant recevra une copie signée et datée du présent formulaire.

\_\_\_\_\_  
Nom du chercheur ou de son représentant (lettres moulées)

\_\_\_\_\_  
Signature du chercheur ou de son représentant

Date : \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_  
jour mois année

## CONSENT FORM

**PROJECT NO:** 2004-05-66

**PROJECT TITLE:** Clearance of iohexol in sujets receiving the combination substance of iohexol-iodixanol contrast.

**PROTOCOL:** N/A

**SPONSOR:** N/A

**PRINCIPAL INVESTIGATOR:** Dr Jean Cusson

**ADDRESS:** Hôpital Charles LeMoyne  
3120, boul. Taschereau  
Greenfield Park (Québec) J4V 2H1

**TELEPHONE:** (450) 466-5000, extension 3106 (Dr. Jean Cusson)  
(514) 925-5969 pager abb. code 700  
(Marie-Claude Denis)

---

### GENERAL DESCRIPTION OF THE PROJECT

You have been asked to participate in a research project concerning the measure of the “clearance of iohexol”, measure made by means of blood tests. The iohexol and the iodixanol are substances of contrast used regularly in radiology during diagnostic examinations.

Recent scientific publications suggest that the measure of the “clearance of iohexol” would be a better reflection of the renal function than the measure of the clearance of creatinine, test used currently but which varies with numerous factors among them, age, weight etc.

We believe that the combination use of both substances of contrasts, approximately 10 % of iohexol and 90 % of iodixanol (rather than 100 % of iodixanol) would allow the safe performance of radiographic imaging with contrast (as an angiography), while simultaneously follow closely the renal function. However, we have first to assess the feasibility of this innovative approach and this project is thus submitted to you because we are recruiting sujets for whom an angiography was ordered.

Approximately 20 sujets will be invited to participate in this research project.

The participation in the study is offered to two groups of sujets:

1. You have to undergo a radiological examination (abdominal and/or lower limbs angiography) with injection of contrast substance at the request of your doctor and your renal function is normal.
2. You have to undergo a radiological examination (abdominal and/or lower limbs angiography) with injection of contrast substance at the request of your doctor but your renal function is decreased.

## **NATURE OF THE PARTICIPATION**

In each of these two circumstances mentioned above, the measure of serum creatinine must normally be done, and sometimes a series of tests must be performed over a period of days to follow the evolution.

We will take 6 blood tests, each of 10 mL (2 teaspoons), for the measure of clearance of iohexol to be done at 1, 2, 3, 4, 8 and 24 hours after of the angiography, besides the blood test taken just before the angiography.

Furthermore, 13 mL of blood will also be taken 4 hours after the angiography to measure the cystatin C and the creatinine to better understand your renal function. The creatinine is routine test but the cystatin C is a more recent test under evaluation.

For both groups of sujets, we shall take a total of 83 mL of additional blood that would usually not have been taken without the project.

So, you will have one blood test before the examination and 6 others after the angiography. All the blood tests will be taken within 24 hours and a small catheter will be left in place, when possible, to reduce the number of venous punctures.

## **RISKS AND INCONVENIENTS**

These additional blood tests may cause you some inconvenience. As much as possible, we will schedule the additional blood tests with those already planned by your doctor.

It is known that the iohexol and the iodixanol contain risks of severe allergies. If you are allergic to the iodine, you should not participate in this study.

## **ADVANTAGES**

This project will not be advantageous to you, at least not in the short term because of its exploratory nature.

## **CONFIDENTIALITY**

All personal information collected during the course of this study will be kept confidential. Except for verifications or external audits the information will be accessible only to members of the study team. You will be giving a numerical code for identification purposes therefore your name will not be used. The key linking your numerical code with your name will be kept at Charles LeMoyne Hospital. Your name or any personal information pertaining to you will not appear in any reports or publications as a result of this study.

By signing this consent form you authorize the investigator to provide your coordinates to the Medical Record's department of Charles LeMoyne Hospital for the purpose of maintaining an institutional register to identify all subjects of the hospital that participated in a research study.

This register is among some of the measures established, by the Ministry of Health and Social Services, for your protection. This will allow the hospital, should the need be, to contact you. None of the information collected will serve research and all information will be destroyed at the latest 12 months following the end of your participation in this research study.

## **COMPENSATION AND CLAUSE OF RESPONSIBILITY**

You will receive no payment for your participation.

However, by signing this consent form, you are not giving up any of your rights. Furthermore, you do not release either the investigator or the sponsor of their legal and professional responsibilities in the eventuality where a situation would cause you damage.

## **CONTACT NAME**

Should you have any questions concerning the study, you may contact Dr Jean Cusson, Principal Investigator, or Suzie Roy or Brigitte Lecours, study nurses, at (450) 466-5000 extension 3106 or Marie-Claude Denis pager no (514) 925-5969 abb. code 700.

The research project and the consent form were approved by the *Comité d'éthique de la recherche de l'Hôpital Charles LeMoyne*. If you wish to obtain additional information regarding your rights as participant in a research project or regarding any damage attributable to the research, harmful side effects to your health, you may

contact the secretary of the *Comité d'éthique de la recherche de l'Hôpital Charles LeMoyne* by calling (450) 466-5000 extension 2564.

### **VOLUNTARY PARTICIPATION**

You are free to participate in this project or to withdraw from it any time with a simple verbal notification, this without prejudice. A withdrawal during the course of the project will mean the destruction of the information and the biological material taken concerning the person having made the request. It is possible, without your consent, that you may be removed from the study at any time by the investigator.



## STATEMENT OF CONSENT

Dr. \_\_\_\_\_ explained me the nature and the procedures of the research project. I read and understood the present consent form. I had the occasion to ask questions about this study and I am satisfied with the answers. I understand that I remain free to withdraw from this study any time, with a simple verbal notification, without this affecting in any way the care from which I could benefit in the future. I certify that I had ample time to make my decision.

After reflection, I agree to participate in this research project. I will receive a copy of this consent form and the original will be placed in my medical chart.

---

Name of the subject (printed letters)

---

Signature of the subject

Date: : \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_  
month    day    year

---

Name of the subject (printed letters)

---

Signature of the subject

Date: : \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_  
month    day    year

## COMMITMENT OF THE INVESTIGATOR

The research project was described and explained to the participant as well as the details of his (her) participation. A member of the research team answered his (her) questions and explained that the participation is free and voluntary and that he (she) could put an end to it at any time. The participant will receive a signed and dated copy the present consent form.

---

Name of the investigator or his representative (printed letters)

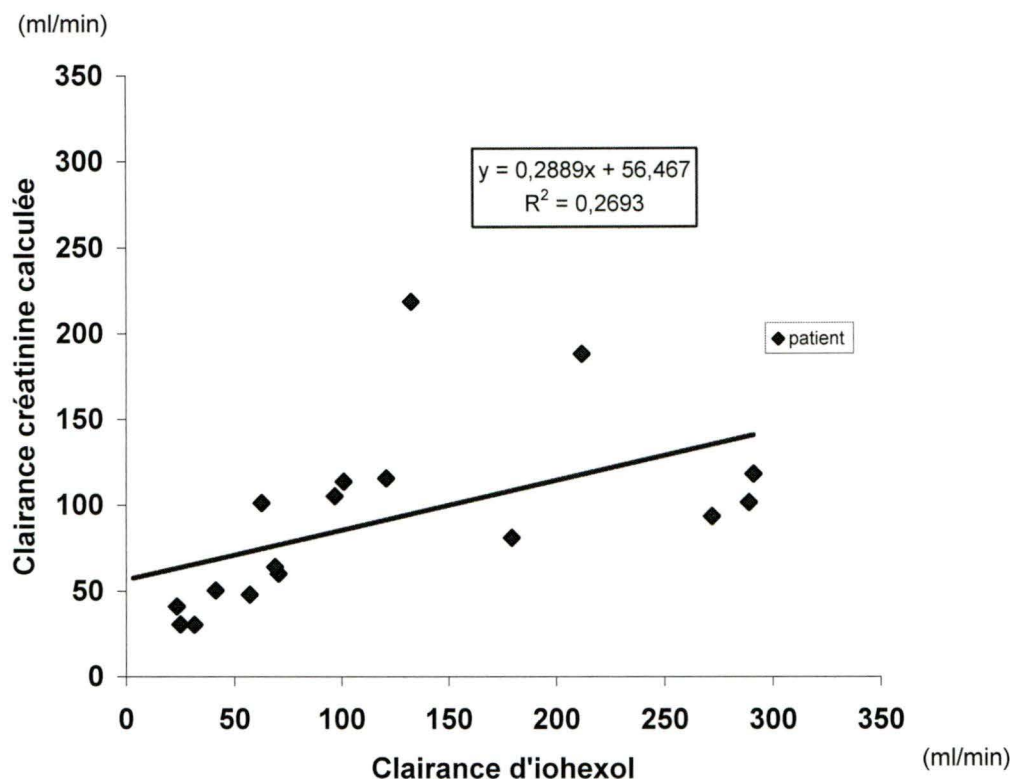
---

Signature of the investigator or his representative

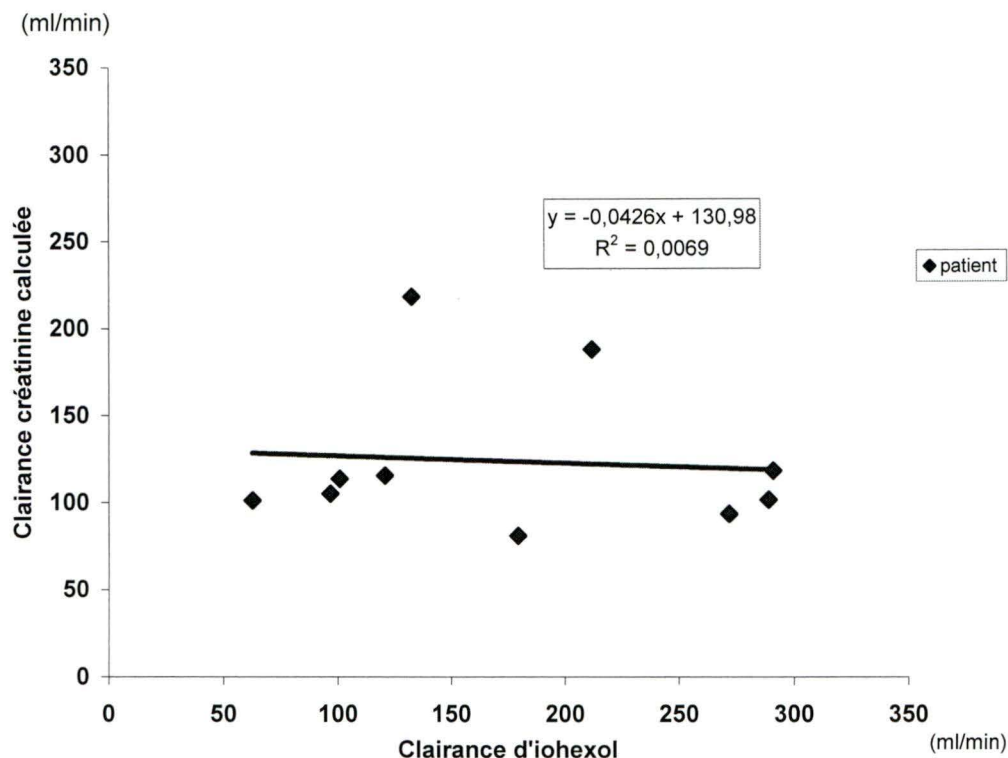
Date: \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_  
month    day    year

## **ANNEXE J**

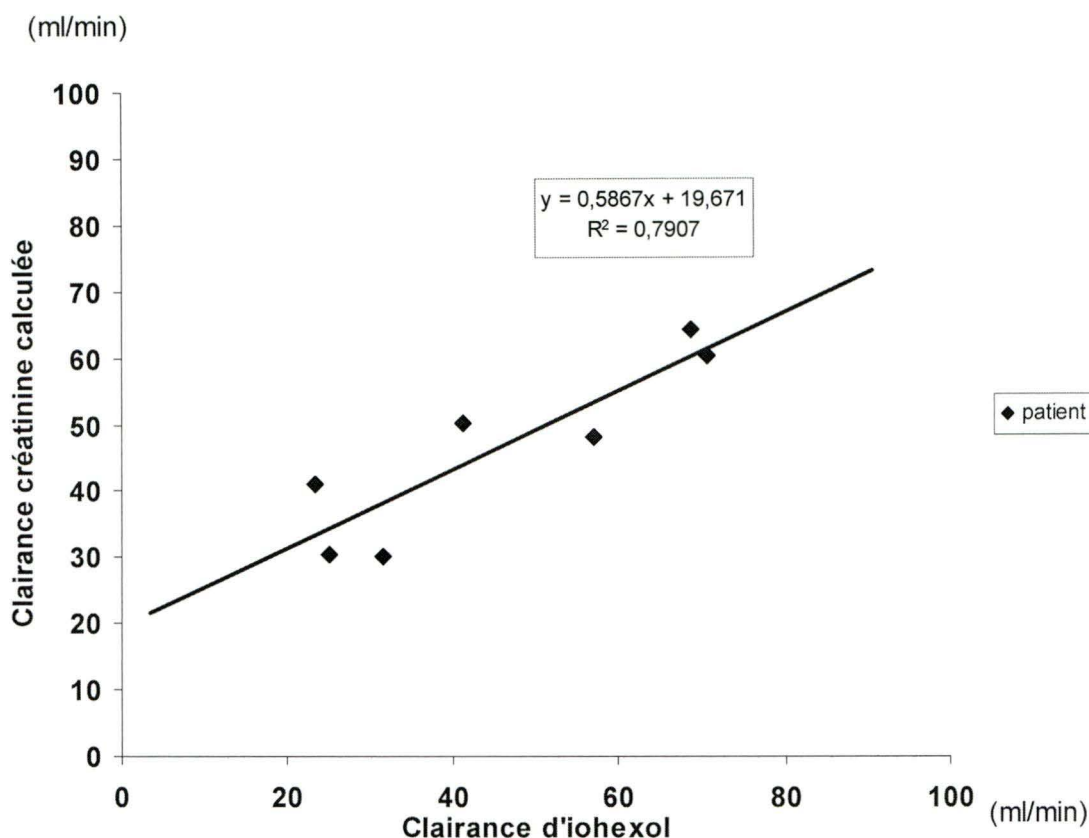
### **GRAPHIQUES DES CORRÉLATIONS ENTRE LA CLAIRANCE DE L'IOHEXOL ET LES MARQUEURS DE FILTRATION GLOMÉRULAIRE CONVENTIONNELS**



**Figure 24 : Détermination de la corrélation entre la clairance de l'iohexol et la clairance de la créatinine calculée (ClCrC) pour la mesure 4 heures post-intervention chez 17 sujets.** Les dosages d'iohexol et de créatinine (voir méthodologie dans le troisième chapitre) ont été effectués sur 17 sujets devant passer une angiographie abdominale et/ou des membres inférieurs avec ou sans angioplastie à la demande de leur médecin traitant. Les 17 sujets devaient appartenir à l'un des deux groupes suivants : le premier groupe constitué de 10 sujets devait avoir une clairance rénale calculée pré-intervention supérieure à 60 mL/min alors que le deuxième groupe, composé de 7 sujets devaient être connus pour avoir un certain degré de dysfonction rénale ( $\leq 60$  mL/min). Les calculs de clairance ont été faits à partir des valeurs des dosages d'iohexol et de Cr plasmatique post-4 heures intervention. La ClCrC a été déterminée par la formule de Cockcroft et Gault. Le coefficient de Pearson (racine carré de  $r^2$ ), qui est égal à 0,519, permet de déterminer la relation entre la clairance de l'iohexol et la ClCrC.

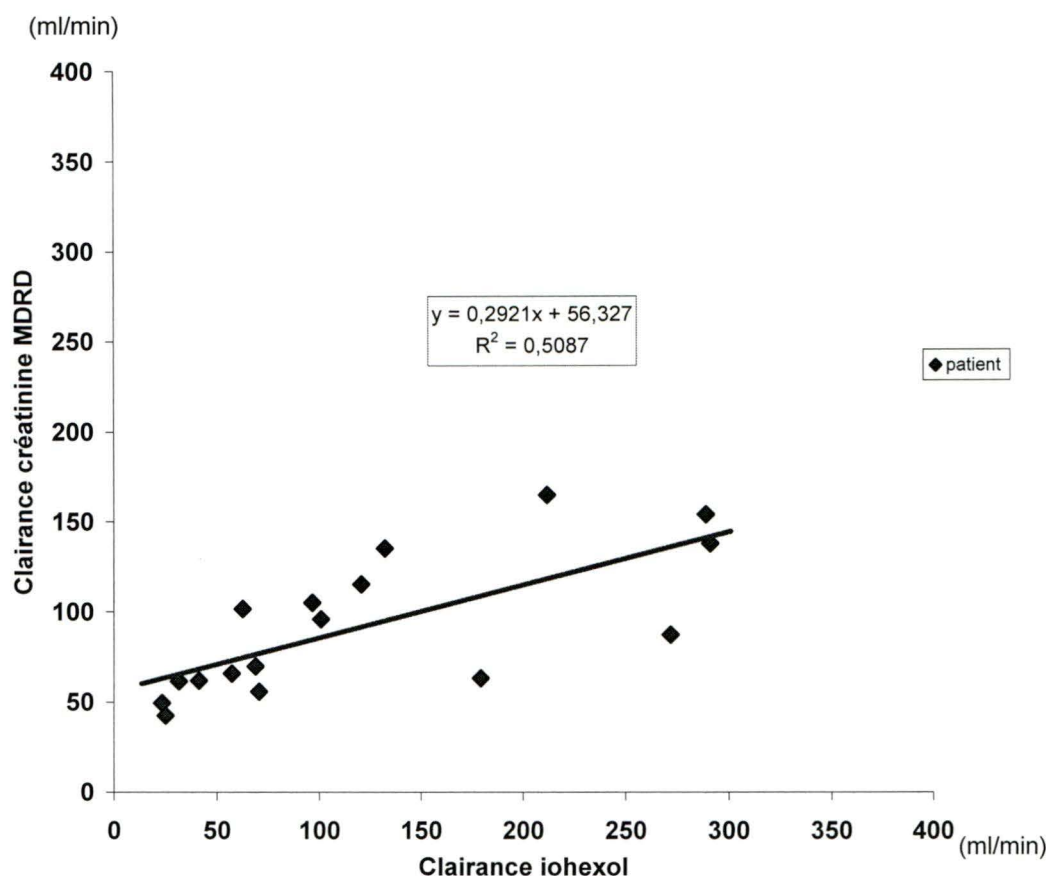


**Figure 25: Détermination de la corrélation entre la clairance de l'iohexol et la clairance de la créatinine calculée (ClCrC) pour la mesure 4 heures post-intervention chez 10 sujets ayant une fonction rénale normale.** Les dosages de l'iohexol et de créatinine (voir méthodologie dans le troisième chapitre) ont été effectués sur 10 sujets devant passer une angiographie abdominale et/ou des membres inférieurs avec ou sans angioplastie à la demande de leur médecin traitant. Ce groupe de sujets devait avoir une clairance rénale calculée pré-intervention supérieure à 60 mL/min. Les calculs de clairance ont été faits à partir des valeurs des dosages de l'iohexol et de Cr plasmatique post-4 heures intervention. La ClCrC a été déterminée par la formule de Cockcroft et Gault. Le coefficient de Pearson (racine carré de  $r^2$ ), qui est égale à 0,0831, permet de déterminer la relation entre la clairance de l'iohexol et la ClCrC.

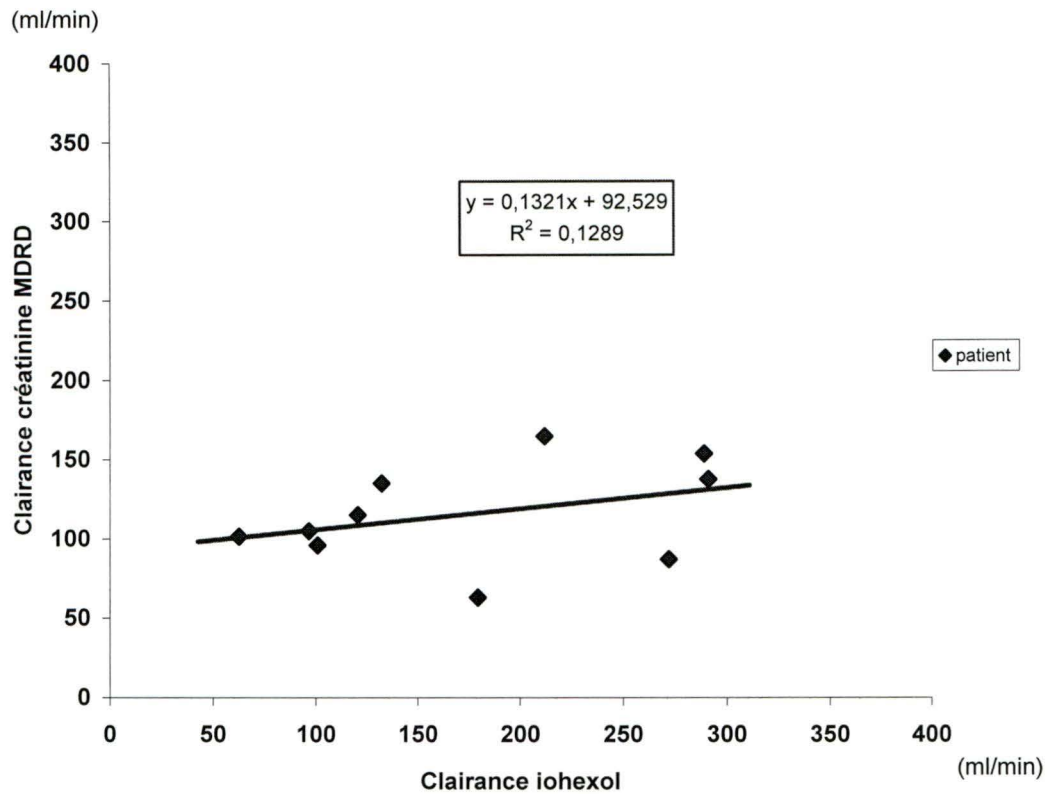


**Figure 26 : Détermination de la corrélation entre la clairance de l'iohexol et la clairance de la créatinine calculée (ClCrC) pour la mesure 4 heures post-intervention chez 7 sujets dont la fonction rénale est diminuée.** Les dosages de l'iohexol et de créatinine (voir méthodologie dans le troisième chapitre) ont été effectués sur 7 sujets devant passer une angiographie abdominale et/ou des membres inférieurs avec ou sans angioplastie à la demande de leur médecin traitant. Ce groupe de sujets devait avoir une clairance rénale calculée pré-intervention inférieure à 60 mL/min. Les calculs de clairance ont été faits à partir des valeurs des dosages de l'iohexol et de Cr plasmatique post-4 heures intervention. La ClCrC a été déterminée par la formule de Cockcroft et Gault. Le coefficient de Pearson (racine carré de  $r^2$ ), qui est égale à 0,889, permet de déterminer la relation entre la clairance de l'iohexol et la ClCrC.

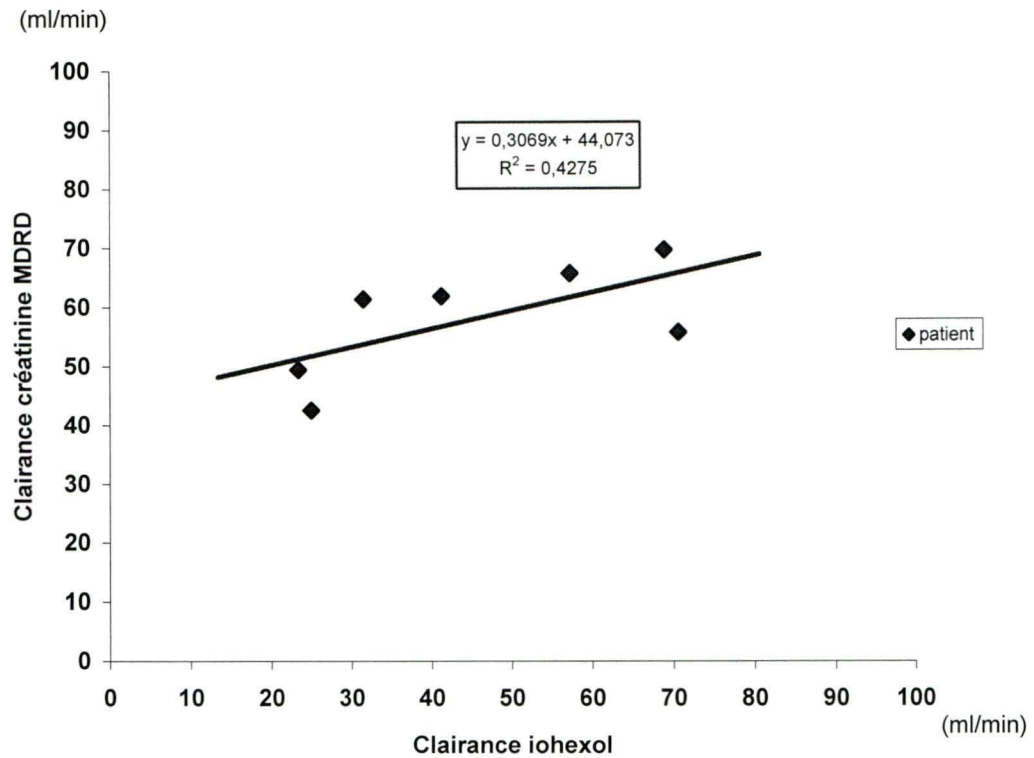




**Figure 27 : Détermination de la corrélation entre la clairance de l'iohexol et la clairance de la créatinine selon le MDRD (CICr MDRD) pour la mesure 4 heures post-intervention chez 17 sujets.** Les dosages de l'iohexol et de créatinine (voir méthodologie dans le troisième chapitre) ont été effectués sur 17 sujets devant passer une angiographie abdominale et/ou des membres inférieurs avec ou sans angioplastie à la demande de leur médecin traitant. Les 17 sujets devaient appartenir à l'un des deux groupes suivants : le premier groupe constitué de 10 sujets devait avoir une clairance rénale calculée pré-intervention supérieure à 60 mL/min alors que le deuxième groupe, composé de 7 sujets devaient être connus pour avoir un certain degré de dysfonction rénale ( $\leq 60$  mL/min). Les calculs de clairance ont été faits à partir des valeurs des dosages de iohexol et de Cr plasmatique post-4 heures intervention. La CICr a été déterminée par la formule du MDRD. Le coefficient de Pearson (racine carré de  $r^2$ ), qui est égale à 0,713, permet de déterminer la relation entre la clairance de l'iohexol et la CICr MDRD.

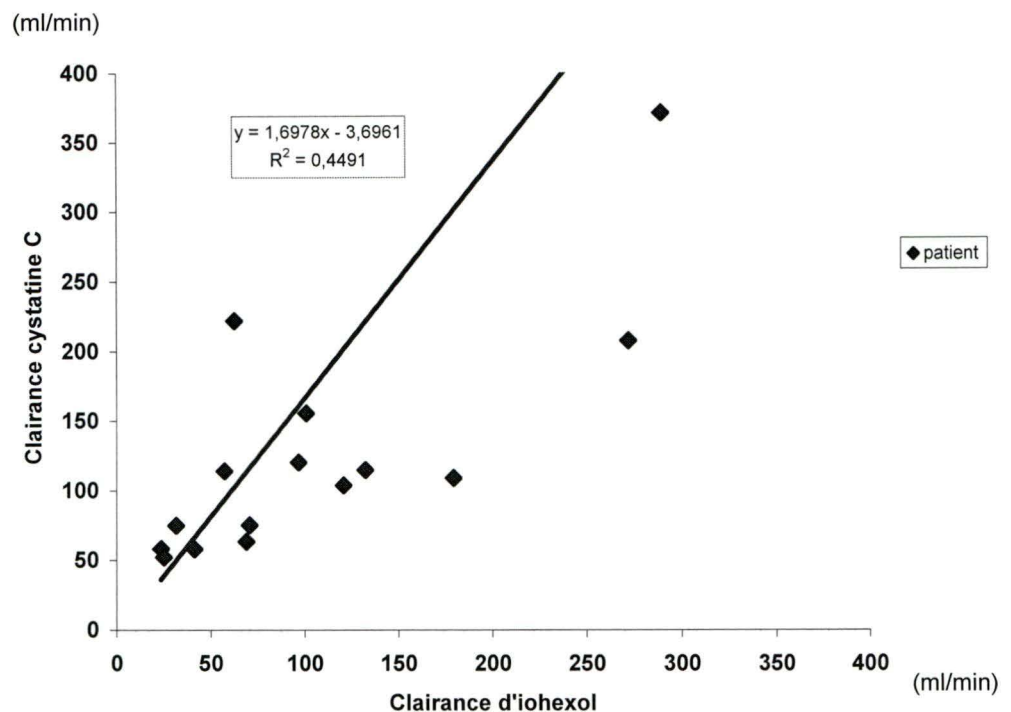


**Figure 28: Détermination de la corrélation entre la clairance de l'iohexol et la clairance de la créatinine selon le MDRD (ClCr MDRD) pour la mesure 4 heures post-intervention chez 10 sujets ayant une fonction rénale normale.** Les dosages de l'iohexol et de créatinine (voir méthodologie dans le troisième chapitre) ont été effectués sur 10 sujets devant passer une angiographie abdominale et/ou des membres inférieurs avec ou sans angioplastie à la demande de leur médecin traitant. Ce groupe de sujets devait être connu pour avoir une fonction rénale normale ( $\geq 60$  mL/min) pré-intervention. Les calculs de clairance ont été faits à partir des valeurs des dosages de iohexol et de Cr plasmatique post-4 heures intervention. La ClCr a été déterminée par la formule du MDRD. Le coefficient de Pearson (racine carré de  $r^2$ ), qui est égale à 0,359, permet de déterminer la relation entre la clairance de l'iohexol et la ClCr MDRD.

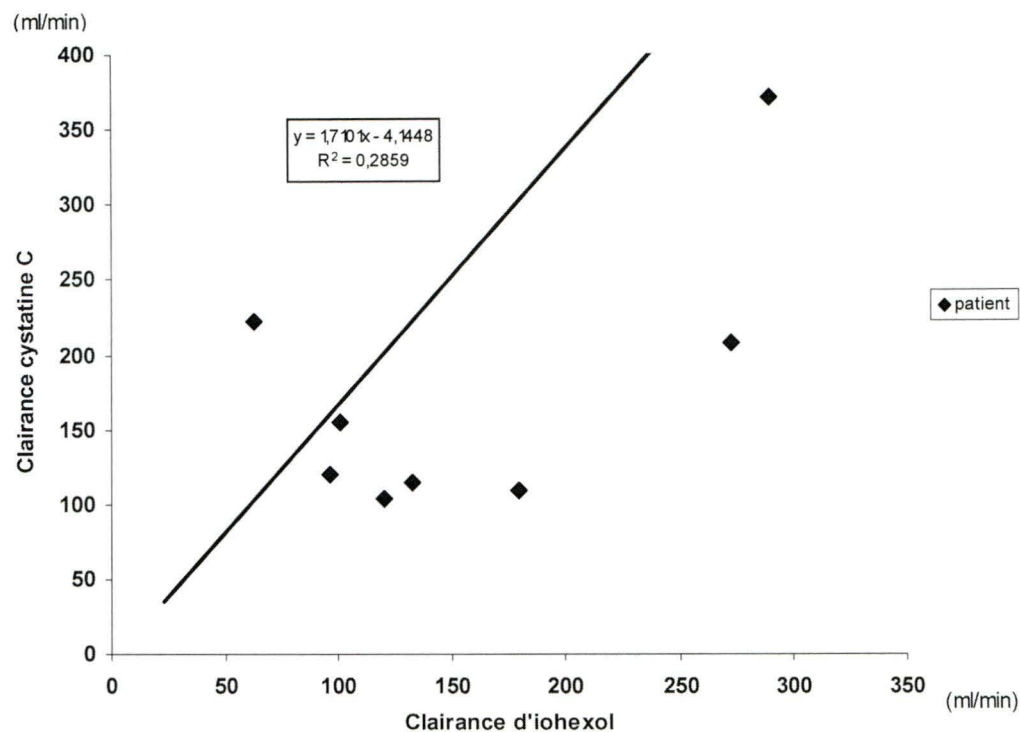


**Figure 29: Détermination de la corrélation entre la clairance de l'iohexol et la clairance de la créatinine selon le MDRD (ClCr MDRD) pour la mesure 4 heures post-intervention chez 7 sujets ayant une fonction rénale réduite.** Les dosages d'iohexol et de créatinine (voir méthodologie dans le troisième chapitre) ont été effectués sur 7 sujets devant passer une angiographie abdominale et/ou des membres inférieurs avec ou sans angioplastie à la demande de leur médecin traitant. Ce groupe de sujets devait être connu pour avoir un certain degré de dysfonction rénale ( $\leq 60$  mL/min) pré-intervention. Les calculs de clairance ont été faits à partir des valeurs des dosages de l'iohexol et de Cr plasmatique post-4 heures intervention. La ClCr a été déterminée par la formule du MDRD. Le coefficient de Pearson (racine carré de  $r^2$ ), qui est égale à 0,654, permet de déterminer la relation entre la clairance de l'iohexol et la ClCr MDRD.

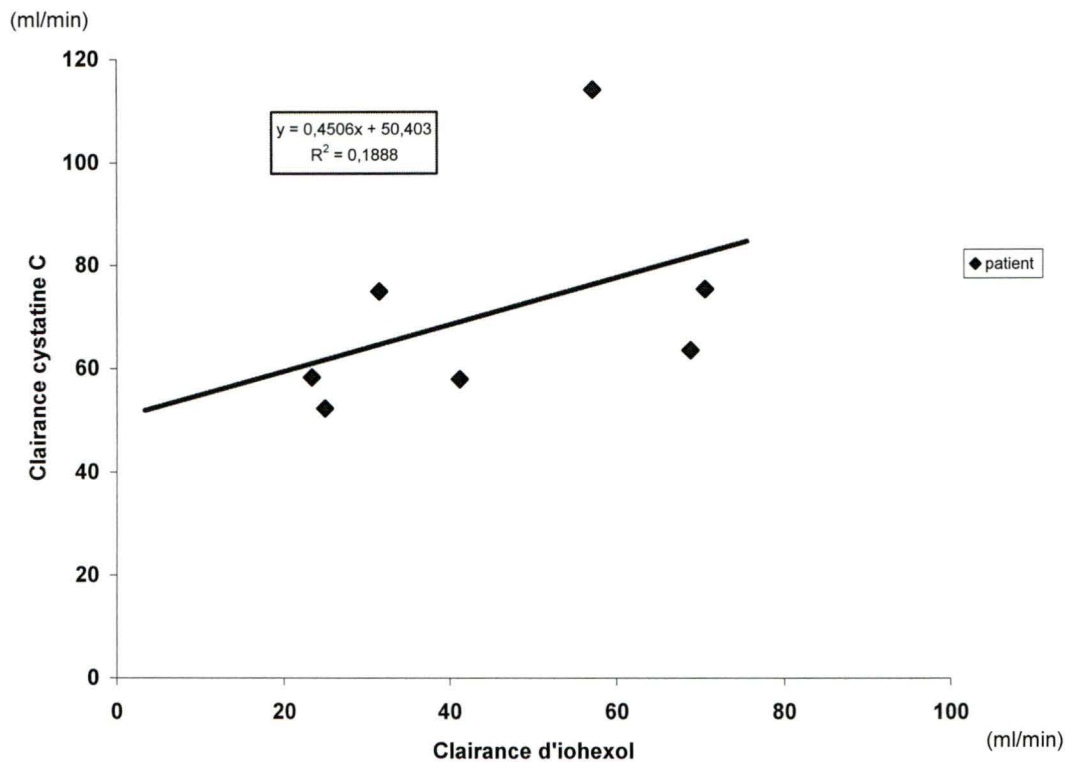




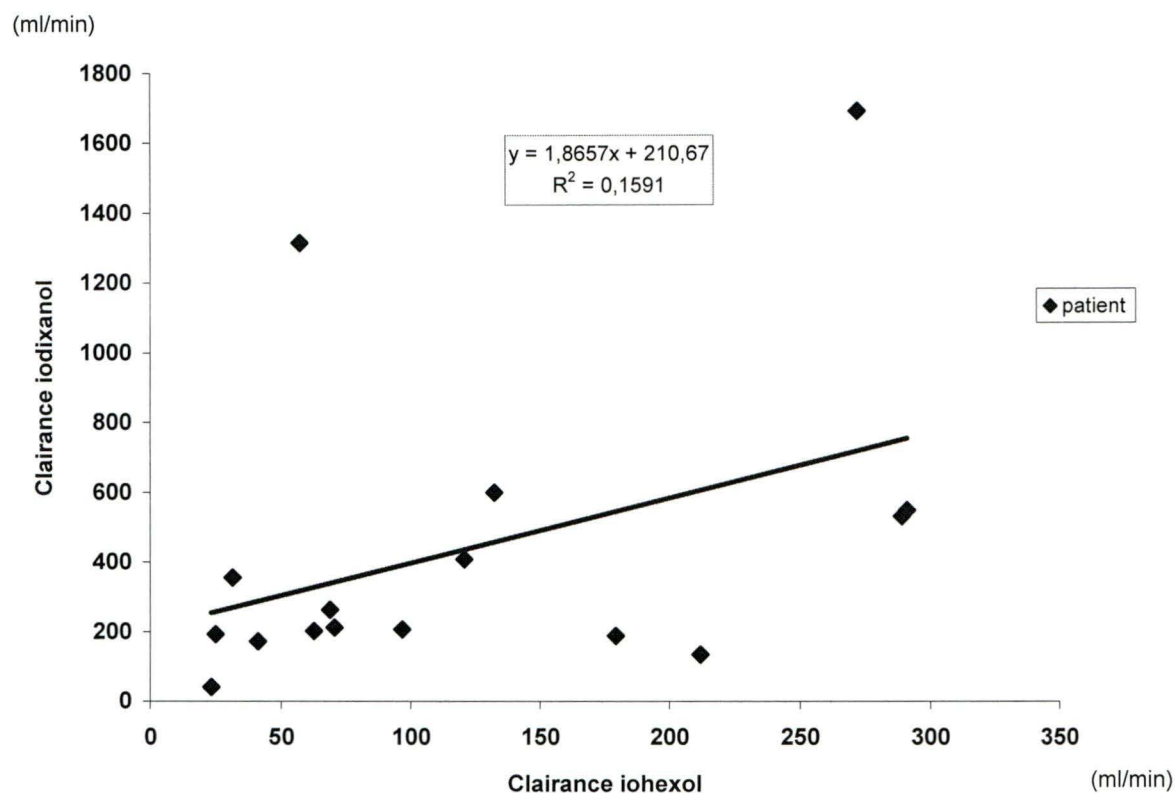
**Figure 30 : Détermination de la corrélation entre la clairance de l'iohexol et la clairance de la cystatine C pour la mesure 4 heures post-intervention chez 17 sujets.** Les dosages d'iohexol et de la cystatine C (voir méthodologie dans le troisième chapitre) ont été effectués sur 17 sujets devant passer une angiographie abdominale et/ou des membres inférieurs avec ou sans angioplastie à la demande de leur médecin traitant. Les 17 sujets devaient appartenir à l'un des deux groupes suivants : le premier groupe constitué de 10 sujets devait avoir une clairance rénale calculée pré-intervention supérieure à 60 mL/min alors que le deuxième groupe, composé de 7 sujets devaient être connus pour avoir un certain degré de dysfonction rénale (< 60 mL/min). Les calculs de clairance ont été faits à partir des valeurs des dosages d'iohexol et de Cys C plasmatique post-4 heures intervention. La ClCys C a été déterminée selon la formule apparaissant dans l'annexe A. Le coefficient de Pearson (racine carré de  $r^2$ ), qui est égale à 0,670, permet de déterminer la relation entre la clairance de l'iohexol et la ClCys C.



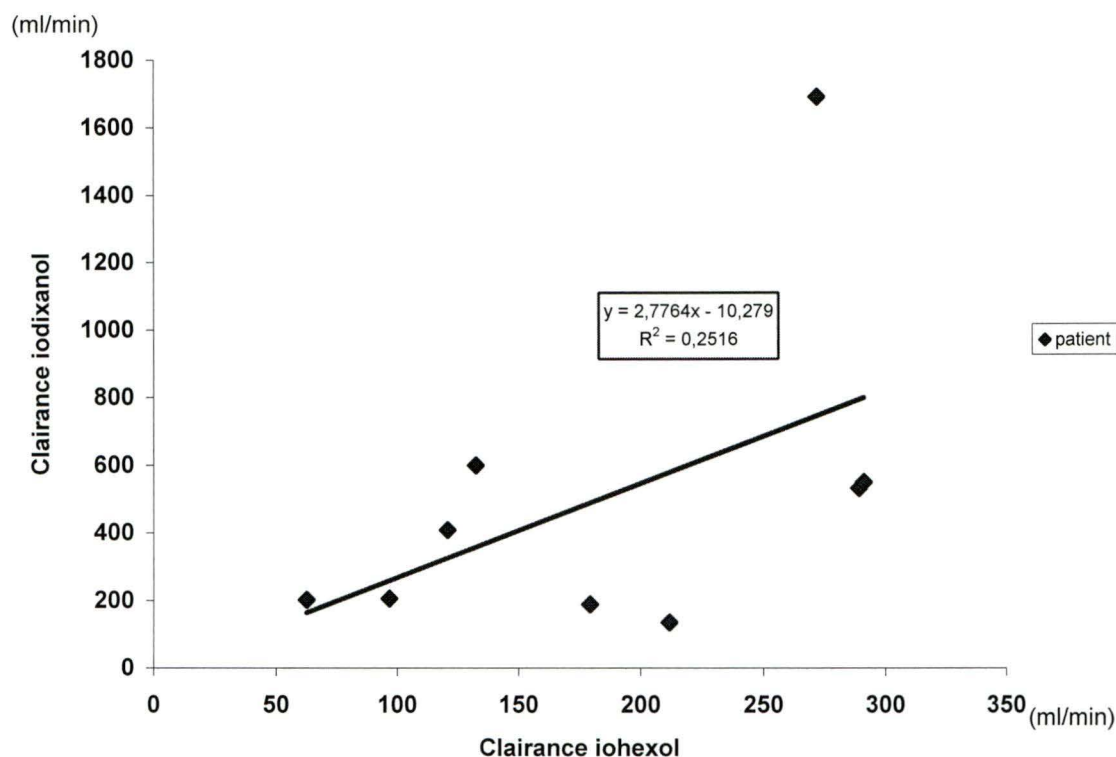
**Figure 31 : Détermination de la corrélation entre la clairance de l'iohexol et la clairance de la cystatine C pour la mesure 4 heures post-intervention chez 10 sujets ayant une fonction rénale normale.** Les dosages d'iohexol et de la cystatine C (voir méthodologie dans le troisième chapitre) ont été effectués sur 10 sujets devant passer une angiographie abdominale et/ou des membres inférieurs avec ou sans angioplastie à la demande de leur médecin traitant. Ce groupe de sujets devait être connu pour avoir une fonction rénale normale ( $\geq 60$  mL/min) pré-intervention. Les calculs de clairance ont été faits à partir des valeurs des dosages d'iohexol et de Cys C plasmatique post-4 heures intervention. La ClCys C a été déterminée selon la formule apparaissant dans l'annexe A. Le coefficient de Pearson (racine carré de  $r^2$ ), qui est égale à 0,535, permet de déterminer la relation entre la clairance de l'iohexol et la ClCys C.



**Figure 32 : Détermination de la corrélation entre la clairance de l'iohexol et la clairance de la cystatine C pour la mesure 4 heures post-intervention chez 7 sujets ayant une fonction rénale réduite.** Les dosages d'iohexol et de la cystatine C (voir méthodologie dans le troisième chapitre) ont été effectués sur 7 sujets devant passer une angiographie abdominale et/ou des membres inférieurs avec ou sans angioplastie à la demande de leur médecin traitant. Ce groupe de sujets devait être connu pour avoir une fonction rénale réduite ( $< 60 \text{ mL/min}$ ) pré-intervention. Les calculs de clairance ont été faits à partir des valeurs des dosages d'iohexol et de Cys C plasmatique post-4 heures intervention. La ClCys C a été déterminée selon la formule apparaissant dans l'annexe A. Le coefficient de Pearson (racine carrée de  $r^2$ ), qui est égale à 0,435, permet de déterminer la relation entre la clairance de l'iohexol et la ClCys C.

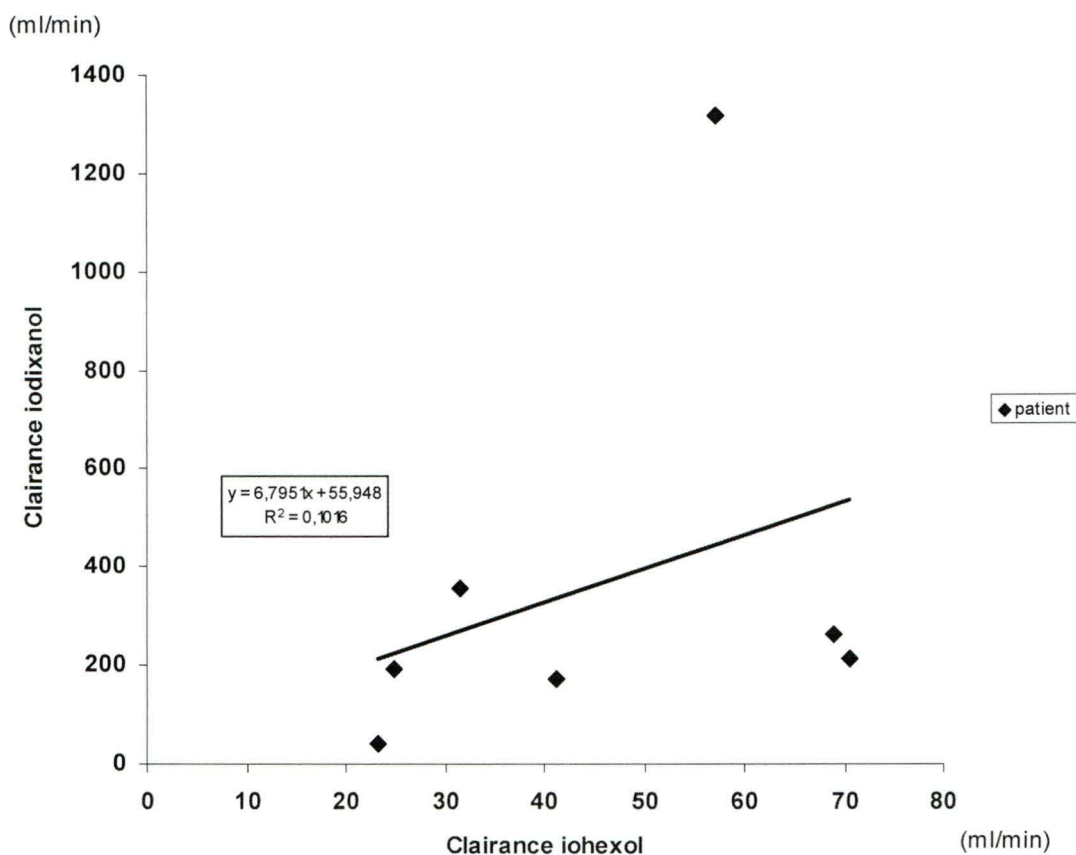


**Figure 33 : Détermination de la corrélation entre la clairance de l'iohexol et la clairance de l'iodixanol pour la mesure 4 heures post-intervention chez 17 sujets.** Les dosages de l'iohexol et de l'iodixanol (voir méthodologie dans le troisième chapitre) ont été effectués sur 17 sujets devant passer une angiographie abdominale et/ou des membres inférieurs avec ou sans angioplastie à la demande de leur médecin traitant. Les 17 sujets devaient appartenir à l'un des deux groupes suivants : le premier groupe constitué de 10 sujets devait avoir une clairance rénale calculée pré-intervention supérieure à 60 mL/min alors que le deuxième groupe, composé de 7 sujets devaient être connus pour avoir un certain degré de dysfonction rénale (< 60 mL/min). Les calculs de clairance ont été faits à partir des valeurs des dosages d'iohexol et d'iodixanol plasmatique post-4 heures intervention. Le coefficient de Pearson (racine carré de  $r^2$ ), qui est égale à 0,399, permet de déterminer la relation entre la clairance de l'iohexol et celle de l'iodixanol.



**Figure 34 : Détermination de la corrélation entre la clairance de l'iohexol et la clairance de l'iodixanol pour la mesure 4 heures post-intervention chez 10 sujets ayant une fonction rénale normale.** Les dosages d'iohexol et de la cystatine C (voir méthodologie dans le troisième chapitre) ont été effectués sur 10 sujets devant passer une angiographie abdominale et/ou des membres inférieurs avec ou sans angioplastie à la demande de leur médecin traitant. Ce groupe de sujets devait être connus pour avoir une fonction rénale normale ( $\geq 60$  mL/min) pré-intervention. Les calculs de clairance ont été faits à partir des valeurs des dosages d'iohexol et d'iodixanol plasmatique post-4 heures intervention. Le coefficient de Pearson (racine carré de  $r^2$ ), qui est égale à 0,502, permet de déterminer la relation entre la clairance de l'iohexol et celle de l'iodixanol.





**Figure 35 : Détermination de la corrélation entre la clairance de l'iohexol et la clairance de l'iodixanol pour la mesure 4 heures post-intervention chez 7 sujets ayant une fonction rénale réduite.** Les dosages d'iohexol et d'iodixanol (voir méthodologie dans le troisième chapitre) ont été effectués sur 7 sujets devant passer une angiographie abdominale et/ou des membres inférieurs avec ou sans angioplastie à la demande de leur médecin traitant. Ce groupe de sujets devait être connu pour avoir une fonction rénale diminuée ( $< 60$  mL/min) pré-intervention. Les calculs de clairance ont été faits à partir des valeurs des dosages d'iohexol et d'iodixanol plasmatique post-4 heures intervention. Le coefficient de Pearson (racine carrée de  $r^2$ ), qui est égale à 0,319, permet de déterminer la relation entre la clairance de l'iohexol et celle de l'iodixanol.

## **ANNEXE K**

### **ANALYSES NON-PARAMÉTRIQUES TEST MANN-WHITNEY-WILCOXON POUR CHACUN DES GROUPES DE SUJETS**

Tableau VII: Corrélations entre les différents marqueurs de filtration glomérulaire chez les 10 sujets ayant une fonction rénale normale.

Corrélations r Pearson (binormalité)		Clairance iohexol	Clairance cystatine C	Clairance créatinine par Cockcroft et Gault	Clairance créatinine par MDRD	Clairance iodixanol
Clairance iohexol	r Pearson	1,00	0,535	-0,0850	0,361	-0,220
	p	-	0,111	0,815	0,306	0,542
Clairance cystatine C	r Pearson	0,535	1,00	0,344	0,705	-0,206
	p	0,111	-	0,330	0,0227	0,569
Clairance créatinine par Cockcroft et Gault	r Pearson	-0,0850	0,344	1,00	0,625	-0,0989
	p	0,815	0,330	-	0,053	0,786
Clairance créatinine par MDRD	r Pearson	0,361	0,705	0,625	1,00	-0,249
	p	0,306	0,0227	0,0533	-	0,487
Clairance iodixanol	r Pearson	-0,220	-0,206	-0,0989	-0,249	1,00
	p	0,542	0,569	0,786	0,487	-

Tableau VIII : Corrélations entre les différents marqueurs de filtration glomérulaire chez les 7 sujets ayant une fonction rénale réduite.

Corrélations r Pearson (binormalité)		Clairance iohexol	Clairance cystatine C	Clairance créatinine par Cockcroft et Gault	Clairance créatinine par MDRD	Clairance iodixanol
Clairance iohexol	r Pearson	1,00	0,434	0,889	0,654	0,319
	p	-	0,331	0,00735	0,111	0,486
Clairance cystatine C	r Pearson	0,434	1,00	0,145	0,499	0,942
	p	0,331	-	0,757	0,254	0,00149
Clairance créatinine par Cockcroft et Gault	r Pearson	0,889	0,145	1,00	0,581	0,0422
	p	0,00735	0,757	-	0,171	0,928
Clairance créatinine par MDRD	r Pearson	0,654	0,499	0,581	1,00	0,455
	p	0,111	0,254	0,171	-	0,305
Clairance iodixanol	r Pearson	0,319	0,942	0,0422	0,455	1,00
	p	0,486	0,00149	0,928	0,305	-



## **ANNEXE M**

### **EXEMPLES DE CALCULS PHARMACOCINÉTIQUES**

## EXEMPLES DE CALCUL PHARMACOCINÉTIQUE

### Sujet 1

$$\text{Concentration iohexol} = \frac{647,1 \text{ g/L}}{821,14 \text{ g/mole}} = 7,8805 \times 10^{-1} \text{ mole/L}$$

Dose iohexol administrée pour un volume de 5 mL :

$$\frac{7,8805 \times 10^{-1} \text{ mole/L} * 5 \text{ ml}}{1000 \text{ mL}} = 3940,25 \text{ } \mu\text{mole}$$

$$\text{Concentration iodixanol} = \frac{652 \text{ g/L}}{1550,2 \text{ g/mole}} = 4,2059 \times 10^{-1} \text{ mole/L}$$

Dose iodixanol administrée pour un volume de 60 mL (le volume administré de l'iodixanol est différent pour chaque sujet) :

$$\frac{4,2059 \times 10^{-1} \text{ mole/L} * 60 \text{ ml}}{1000 \text{ mL}} = 25235,1 \text{ } \mu\text{mole}$$

$C_0$  = valeur de b dans l'équation logarithmique, la valeur du  $C_0$  est retransformée pour fin des calculs en  $\mu\text{mol/L}$

Volume apparent de l'iohexol ( $V_{app}$ ):

$$V_{app} = \frac{\text{dose}}{C_0} = \frac{3940,25 \text{ } \mu\text{mole}}{65,7 \text{ } \mu\text{mole/L}} = 60,0 \text{ L}$$

Constante d'élimination de l'iohexol ( $k_e$ ) :

$$\text{où } m = -\left(\frac{k_e}{2,303}\right) \quad \text{alors} \quad k_e = |0,0779 \times 2,303| = 0,179$$

Temps de demi-vie de l'iohexol ( $t_{1/2}$ ):

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{k_{e\beta}} = 0,179 \text{ heure}$$

Clairance de l'iohexol (Cl):

$$Cl = k_{e\beta} \times V_{app} = 0,179 \times 60 \text{ L} = 10,8 \text{ L/h} \text{ ou } 179 \text{ ml/min}$$